

**Telemetrische Untersuchungen zur Belastung von Mäusen  
durch verschiedene Methoden der Blutentnahme,  
Kennzeichnung und durch chronischen Stress**

**von Lena Hornetz**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Telemetrische Untersuchungen zur Belastung von Mäusen  
durch verschiedene Methoden der Blutentnahme,  
Kennzeichnung und durch chronischen Stress

von Lena Hornetz

aus Saarlouis

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde,  
Tierhygiene und Tierhaltung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Univ.-Prof. Dr. Dr. M. Erhard

Angefertigt am  
Zentrum für Präklinische Forschung,  
Deutsches Krebsforschungszentrum,  
Heidelberg

Mentor:  
Prof. Dr. K. Reifenberg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

*Meiner Familie,  
die mich großzügig und aus vollem Herzen unterstützt hat,  
damit ich den Weg gehen konnte  
den ich mir ausgesucht habe.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b>	<b>6</b>
2.1	Die Maus als Tiermodell . . . . .	7
2.1.1	Physiologische Parameter der Maus . . . . .	7
2.1.2	Bedeutung der Maus für die Forschung . . . . .	7
2.2	Telemetrie in der Versuchstierkunde . . . . .	8
2.2.1	Definitionen . . . . .	8
2.2.2	Geschichte der Telemetrie . . . . .	8
2.2.3	Vorzüge der Telemetrie und Validierung der Ergebnisse . . . . .	9
2.2.4	Telemetrie als Methode zur Belastungserfassung . . . . .	10
2.3	Stress und Belastung von Mäusen . . . . .	11
2.3.1	Definitionen . . . . .	12
2.4	Blutentnahme bei Versuchstieren . . . . .	12
2.4.1	Allgemeine Aspekte . . . . .	12
2.4.2	Blutentnahme aus der Vena saphena . . . . .	14
2.4.3	Blutentnahme aus der Schwanzvene . . . . .	15
2.4.4	Blutentnahme aus der Vena facialis . . . . .	16
2.4.5	Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus . . . . .	17
2.5	Kennzeichnung von Versuchstieren . . . . .	18
2.5.1	Allgemeine Aspekte . . . . .	18
2.5.2	Kennzeichnung mittels Ohrlochung . . . . .	18
2.5.3	Kennzeichnung mittels Ohrmarke . . . . .	19
2.5.4	Kennzeichnung mittels RapID . . . . .	20
2.5.5	Kennzeichnung mittels p-Chip . . . . .	21
2.6	Langzeitbelastung durch Routineprozeduren . . . . .	22
2.6.1	Experimentelle Atheroskleroseforschung . . . . .	24
2.6.2	Tag/Nacht-Rhythmus . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Tiere, Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Fragestellung und Methodenwahl . . . . .	27
3.1.1	Fragestellung . . . . .	27
3.1.2	Methodenwahl . . . . .	28
3.2	Tiere und Telemetrie . . . . .	28

3.2.1	Tiere und Tierhaltung . . . . .	28
3.2.2	Tierschutzrechtliche Genehmigung . . . . .	30
3.2.3	Telemetrische Untersuchungen . . . . .	30
3.3	Versuchsplanung und Durchführung . . . . .	35
3.3.1	Methoden der Blutentnahme . . . . .	35
3.3.2	Methoden der Kennzeichnung . . . . .	40
3.3.3	Chronisches Stressmodell . . . . .	44
3.4	Graphische Darstellung und statistische Auswertung . . . . .	47
3.4.1	Graphische Darstellung der Ergebnisse . . . . .	47
3.4.2	Statistische Auswertung . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
4.1	Verschiedene Methoden der Blutentnahme . . . . .	51
4.1.1	Blutentnahme aus der Vena saphena . . . . .	51
4.1.2	Blutentnahme aus der Schwanzvene . . . . .	56
4.1.3	Blutentnahme aus der Vena facialis . . . . .	64
4.1.4	Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus . . . . .	75
4.1.5	Statistik . . . . .	80
4.2	Verschiedene Methoden der Kennzeichnung . . . . .	81
4.2.1	Kennzeichnung mittels Ohrmarkierung (Ohrloch, Ohrmarke, RapID) . . . . .	81
4.2.2	Kennzeichnung mittels p-Chip . . . . .	92
4.2.3	Statistik . . . . .	101
4.3	Chronisches Stressmodell . . . . .	103
4.3.1	Übersichtsdarstellung des Tag/Nacht-Rhythmus . . . . .	103
4.3.2	Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus . . . . .	105
4.3.3	Körpergewicht . . . . .	111
4.3.4	Statistik . . . . .	112
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
5.1	Diskussion der Methode . . . . .	114
5.1.1	Tierauswahl . . . . .	114
5.1.2	Telemetrie . . . . .	115
5.1.3	Versuchsaufbau: Methoden der Blutentnahme . . . . .	116
5.1.4	Versuchsaufbau: Methoden der Kennzeichnung . . . . .	117
5.1.5	Versuchsaufbau: Chronisches Stressmodell . . . . .	118
5.1.6	Interpretation der statistischen Signifikanz . . . . .	118
5.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	119
5.2.1	Beurteilung der verschiedenen Methoden der Blutentnahme . . . . .	119
5.2.2	Beurteilung der verschiedenen Methoden der Kennzeichnung . . . . .	123
5.2.3	Beurteilung des chronischen Stressmodells . . . . .	127
5.3	Gesamtdiskussion . . . . .	128

---

5.3.1	Ausblick . . . . .	130
5.3.2	Replace, Reduce, Refine . . . . .	131
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>132</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>134</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>136</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>138</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>139</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>150</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>151</b>



# 1 Einleitung

Tierversuche werden in unserer Gesellschaft hochambivalent betrachtet und es besteht ein allgemeiner Konsens, sie auf ein unabdingbares Maß zu reduzieren.

Bereits 1959 haben die englischen Wissenschaftler Russel und Burch in ihrem Buch *The principles of humane experimental technique* die **3R** Leitlinien postuliert, die bis heute einen hohen Stellenwert besitzen [Russell et al., 1959]. Sie forderten eine Reduzierung der Versuche sowie der Versuchstiere auf ein unabdingbares Maß (**R**eduction), eine Verbesserung und Verfeinerung der Versuchsabläufe und -bedingungen (**R**efinement) und den Ersatz von Tierversuchen durch tierversuchsfreie Verfahren (**R**eplace). Für die meisten Eingriffe, die an Versuchstieren praktiziert werden, besteht bis heute keine klare Vorstellung über die damit verbundene Belastung für das einzelne Tier. Nichtsdestoweniger gilt für sämtliche europäische Wissenschaftler neben dem humanitären und ethischen Anspruch auch eine rechtliche Verpflichtung zur Minimierung von Schmerz und Leiden. Zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere wurde die EU Richtlinie 2010/63/EG verabschiedet, die mit der Novelle des Deutschen Tierschutzgesetzes und der Etablierung der Tierschutz-Versuchstierverordnung im Jahr 2013 in nationales Recht überführt wurde.

Zurzeit werden Belastung, Schmerzen und Leiden von Versuchstieren in den meisten Fällen nicht objektiv erfasst. Zur Bewertung werden häufig Vergleiche mit dem Mensch herangezogen oder es erfolgt eine Einschätzung auf Grund klinischer Parameter, Verhaltensbeobachtungen oder pathologischen Veränderungen. Die bei anderen Spezies gern genutzte klinische Untersuchung oder Verhaltensbeobachtung ist bei kleinen Labortieren jedoch methodisch limitiert und unterliegt immer einem Observer-Effekt, das heißt die Untersuchung selbst wirkt als belastender Faktor [Sorge et al., 2014].

Aktuelle Zahlen der europäischen Kommission zeigen, dass die Maus mit steigendem Trend das am häufigsten genutzte Versuchstier ist. Diesem Umstand muss im Bereich des Refinements Rechnung getragen werden. Die *Verfeinerung* beinhaltet dabei sämtliche Maßnahmen, die für die Labortiere eine Verringerung der Stresssituation bedeuten.

Ziel dieser Dissertation ist es Belastungen, die durch verschiedene Formen der Kennzeichnung und der Blutentnahme sowie chronischen Stress entstehen, telemetrisch zu erfassen und wissenschaftlich fundiert einzuschätzen. Diese tierexperimentellen Eingriffe sind in den meisten komplexen Versuchsanordnungen eine unabdingbare Maßnahme, obwohl in vielen Fällen bis heute keine klare Vorstellung über die damit verbundene Belastung besteht. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die objektive und reproduzierbare Erhebung von Daten sowie deren Beurteilung im Rahmen des Refinements. Hierzu bietet die Telemetrie die Möglichkeit, die Herzfrequenz und andere belastungsrelevante Parameter wie die Körperkerntemperatur und die Aktivität ohne den Einfluss eines Beobachters zu erfassen, und ist somit für diese Fragestellung die Methode der Wahl.

## **2 Literatur**

## 2.1 Die Maus als Tiermodell

Unsere heute verwendeten Labormäuse sind Abkömmlinge der Hausmaus (*Mus musculus*). Diese gehört innerhalb der Säugetiere zur Ordnung der Nagetiere (*Rodentia*), zur Überfamilie der Langschwanzmäuse (*Muridae*), zur Unterfamilie der Altweltmäuse (*Murinae*) und zur Gattung der echten Mäuse (*Mus*). Aufgrund der kommensalen Lebensweise umfasst das Verbreitungsgebiet der Hausmaus nahezu alle Länder. Ihr ursprünglicher Lebensraum sind Savannen und Steppen wo sie in großen Familiengruppen leben. Mäuse sind Allesfresser mit hoher Fruchtbarkeit und kurzer Generationsfolge. Sie besitzen einen ausgeprägten Hell/Dunkel-Rhythmus mit der Aktivitätsperiode in der Dunkelphase (Nacht) [Ewringmann and Glöckner, 2014, Weiss et al., 2014].

### 2.1.1 Physiologische Parameter der Maus

In der Literatur findet sich eine große Varianz an Angaben zu den normalen Werten von Herzfrequenz, Atemfrequenz und Körpertemperatur der Maus. Dies resultiert aus dem jeweiligen Aktivitätszustand der Maus sowie dem Tageszeitpunkt der Datenerhebung. Eine Übersicht aus wissenschaftlichen Artikeln, Fachbüchern oder Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) findet sich in der nachfolgenden Tabelle.

**Tabelle 2.1 :** Relevante physiologische Parameter der Maus

Quelle	Körpertemperatur [°C]	Herzfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]	Atemfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]
Arras, 2007a	-	$501 \pm 14$	-
Baumgartner, 2005	-	320 - 780	84 - 230
Erhardt, 2012	37,5 - 38,5	310 - 840	100 - 160
Ewringmann und Glöckner, 2014	38,0 - 39,5	350 - 600	70 - 220
GV SOLAS-Ausschuss für Ernährung der Versuchstiere, 2003	36,0 - 38,0	300 - 800	163 (84 - 230)
Kramer, 1993	-	450 - 500	-

### 2.1.2 Bedeutung der Maus für die Forschung

Bereits im 16. Jahrhundert wurden Mäuse zur biomedizinischen Forschung eingesetzt und sie sind untrennbar mit wichtigen medizinischen Entdeckungen während des 20. Jahrhunderts verknüpft [Hedrich, 2012]. Sie stellten damals wie heute eine der bedeutsamsten Versuchstierspezies dar [Malakoff, 2000]. Laut Bericht der europäischen Kommission beläuft sich im Jahr 2011 die Gesamtzahl der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere in der Europäischen Union auf ca. 11,5 Millionen Tiere. Mit

einem Anteil von 61 % stellt dabei die Maus die mit Abstand am häufigsten verwendete Spezies dar [Europäische Kommission, 2013].

Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme C57BL/6 und BALB/c (siehe auch Tabelle 3.1) zählen zu den am häufigsten verwendeten Inzuchtlinien weltweit [Fox et al., 2006]. Ebenso ist die Apoe knockout Maus (Apoe<sup>-/-</sup>) auf C57BL/6 Hintergrund ein häufig genutztes Atherosklerosemodell in der medizinischen Forschung [Pendse et al., 2009].

## 2.2 Telemetrie in der Versuchstierkunde

### 2.2.1 Definitionen

Das Wort Telemetrie stammt aus dem altgriechischen und setzt sich aus tele „fern“ und metron „messen“ zusammen. Somit ist die Telemetrie die „Fernübertragung von Messgrößen“ [Psyhyrembel, 2013]. Der Begriff Biotelemetrie umfasst die „Funkübertragung biologischer und medizinischer Messwerte (z. B. von Blutdruck, Körpertemperatur, Herz- oder Hirnströmen: Elektrokardiogramm, Elektroenzephalogramm), die durch einen Biosensor in elektrische Signale umgewandelt worden sind“ [Freudig, 2006].

### 2.2.2 Geschichte der Telemetrie

Auch wenn die technischen Voraussetzungen zur telemetrischen Messung physiologischer Parameter von Labortieren schon seit einiger Zeit existieren, sind doch erst in den letzten Jahrzehnten zuverlässige und einfach zu bedienende Anlagen für die biomedizinische Forschung auf dem Markt. Dieser Umstand führte zu einer verstärkten Nutzung von implantierbaren Telemetriesystemen, ein Trend der sich im deutlichen Anstieg an Literaturberichten zu diesem Thema zeigt [Kramer et al., 2001].

Die erste Nutzung der Telemetrie in der Forschung geht auf den französischen Wissenschaftler Maurey (1869) und seine Versuche an Tauben zurück [Kramer et al., 2001]. In den 1950er Jahren führten die Arbeitsgruppen um Barr (1954) und Farrar (1957) telemetrische Versuche zum EKG und der Magen-Darmmotilität am Menschen durch [Kramer et al., 2001]. Zur gleichen Zeit wurde der russische Hund Laika, telemetrisch ausgerüstet, in den Weltraum geschickt und die veränderten physiologischen Parameter von der Erde aus gemessen. Diese frühen telemetrischen Systeme hatten noch keinen implantierten Sender sondern waren häufig in Form eines Rucksacks am Tier befestigt. 1965 beschrieben Deboo und Fryer eines der ersten implantierbaren telemetrischen Systeme zur Messung kardiovaskulärer Parameter in Mensch und Huhn [Kramer et al., 2001]. Die erste Telemetrie bei der Maus wurde von Carson 1972 beschrieben, wobei hier noch ein nicht-implantiertes System verwendet wurde [Kramer et al., 2001]. Erste Studien mit einem implantierten kommerziellen Telemetrie-

system zur Messung von Körpertemperatur und Aktivität von Mäusen erfolgten 1989 von Clement [Clement et al., 1989]. 1993 folgte die telemetrische Messung von Herzfrequenz und EKG in sich frei bewegenden Mäusen durch Kramer [Kramer et al., 1993].

Neben den vor allem in den Anfängen noch selbstgebaute Telemetrieanlagen sind mittlerweile kommerziell hergestellte Systeme erhältlich. Große Anbieter hierzu sind beispielsweise Biomedic Data Systems (BMDS; Seaford, USA) oder Data Sciences International (DSI; St. Paul, USA) [Kramer et al., 2001].

### 2.2.3 Vorzüge der Telemetrie und Validierung der Ergebnisse

Die Telemetrie vereint viele Anforderungen, die wir an moderne Messmethoden stellen und ist eine ausgezeichnete Alternative zu konventionellen Möglichkeiten der Datenerhebung in der biomedizinischen Forschung [Cesarovic et al., 2011]. Es werden Daten von nicht fixierten, sich in ihrer gewohnten Umgebung frei bewegenden Tieren generiert. Dies hat den Vorteil einer deutlichen Stressreduktion bei der Messung, da eine Fixierung zur Datenerhebung nicht mehr notwendig ist [Kramer et al., 2001]. Ein dem Hawthorne-Effekt ähnliches Phänomen konnte auch von Sorge et al. für Mäuse gezeigt werden [Sorge et al., 2014]. Der Hawthorne-Effekt besagt, dass Studienteilnehmer ihr natürliches Verhalten ändern, wenn sie sich ihrer Beobachtung bewusst sind. So führt die Anwesenheit von Experimentatoren im Raum, abhängig von deren Geschlecht, zu deutlich veränderten Reaktionen der Versuchstiere [Sorge et al., 2014]. Telemetrische Messungen umgehen dieses Problem, da für die Datenerhebung selbst keine Person vor Ort anwesend sein muss. Dies verringert Artefakte und interindividuelle Schwankungen, steigert die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und leistet somit einen wertvollen Beitrag zum Refinement gemäß der 3R Leitlinien [Grenwis, 2010, Baumans et al., 2001, Kramer et al., 1993]. Auch der *Reduce* Komponente von Russel und Burch wird Rechnung getragen: laut Kramer et al. kommt es zu einer Tierzahlverringerung von bis zu 90 % in Mehrfachstudien, da die Tiere zum einen als ihre eigenen Kontrollen fungieren können, zum anderen auch die Qualität der Daten deutlich besser ist, so dass Wiederholungen zum größten Teil vermieden werden können [Kramer et al., 2001]. Ein weiterer Vorteil ist die durchgehende Datenerhebung über Tage, Wochen oder Monate, ohne dass neben der Grundversorgung der Tiere spezielle Aufwendungen notwendig sind. So können akkurate und reproduzierbare Ergebnisse für lange Zeiträume ermittelt werden.

Es wird offensichtlich, dass die Telemetrie zur Erfassung von Stress mittels kardiovaskulärer Parameter zum Gold-Standard geworden ist. Telemetrische Techniken machen es möglich, physiologische Variablen verbunden mit nur einem Minimum an Störungen aufzuzeichnen und zu analysieren. Das Fehlen einer Fixierung zur Datenerhebung und die Möglichkeit der freien Bewegung reduzieren Stress und erleichtern

das Interpretieren der Daten. Zudem ist es möglich, die Tiere in ihrem gewohnten Umfeld zu belassen und soziale Interaktionen aufzuzeichnen. Es ist offenkundig, dass die Interpretation physiologischer Daten, die mit anderen Messmethoden erhoben wurden, für Fehler anfällig ist, da Stress auf Grund räumlicher Enge oder menschlicher Interaktion entstehen kann [Axelsson et al., 2007]. Dieser Umstand wird durch implantierbare Telemetriesysteme vermieden.

Insbesondere die niederländische Arbeitsgruppe um Klaas Kramer hat intensiv Daten unterschiedliche Techniken und telemetrisch erhobenen Daten miteinander verglichen [Kramer and Kinter, 2003, Kramer et al., 2001, Kramer et al., 1993]. Dabei konnten sie zeigen, dass die telemetrischen Daten beispielsweise zu Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität sowohl in ihrer relativen Tendenz (Anstieg bzw. Abfall) als auch in ihrem absoluten Wert mit den Daten, die über andere Techniken erhoben wurden, übereinstimmen.

## 2.2.4 Telemetrie als Methode zur Belastungserfassung

Das Erkennen von Schmerz, Leiden und Schäden bei Versuchstieren ist schon seit längerem Gegenstand zahlreicher Diskussionen in der Fachliteratur. Bereits 1985 wurden hierzu Richtlinien erarbeitet [Morton and Griffiths, 1985].

Die Tabelle von Kretlow (Tabelle 2.2 modifiziert und aus dem Englischen übersetzt) gibt einen Überblick über die aktuell in der Wissenschaft eingesetzten Methoden zur Belastungserfassung von Versuchstieren [Kretlow et al., 2010].

**Tabelle 2.2 :** Methoden zur Erkennung von Schmerz und Stress bei Labortieren [Kretlow et al., 2010, modifiziert und aus dem Englischen übersetzt]

	Telemetrie	Stresshormone	Vokalisation	Verhalten
Geschwindigkeit	-	++	++	++
Objektivität	++++	++++	+++	+
Zuverlässigkeit	++++	++++	?	?
Quantifizierbarkeit	ja	ja	ja?	ja?
Invasivität	ja	ja/nein	nein	nein
Tiermanipulation	nein	ja/nein	ja?	nein
Probleme	teuer	teuer	Interpretation	Interpretation
Einzelhaltung	ja	nein	ja	ja/nein?

Es wird apparent, dass nach aktueller Einschätzung lediglich die telemetrische Messung von Kreislauf- und Aktivitätsparametern ausreichend objektiv und zuverlässig über einen längeren Zeitraum hinaus ist. In der vorliegenden Arbeit soll die telemetrische Messung des kardiovaskulären Parameters Herzfrequenz und die telemetrische Bestimmung der Körpertemperatur und der Mobilität der Versuchstiere dazu genutzt

werden die Belastung von Mäusen durch spezifische, häufig praktizierte, experimentelle Eingriffe in objektiver und reproduzierbarer Weise darzustellen.

Auf die Relevanz wird auch deutlich vom Ausschuss für Labortierhaltung der Gesellschaft der Versuchstierkunde in der Empfehlung zu Schmerz und Distress bei Labornagern und Kaninchen hingewiesen <sup>1</sup>: im Allgemeinen wird von wissenschaftlichen Versuchsprojekten verlangt, dass Belastungen vermieden werden sollen, sofern es mit dem Versuchsziel vereinbar ist [GV-SOLAS, 1992]. Alternativen sind in Betracht zu ziehen und, wenn immer möglich, anzuwenden [GV-SOLAS, 1992]. Grundsätzlich kann man Belastung qualitativ und mehr oder weniger auch quantitativ messen. Beides beinhaltet zwei Stufen, den möglichst objektiven Schritt der Datenerhebung und den subjektiven Schritt der Übersetzung in Schweregrade [GV-SOLAS, 1992].

Änderungen in der Körperkerntemperatur und der Herzfrequenz sind bereits häufig dokumentierte physiologische Manifestationen von Stress [Harkin et al., 2002, van den Buuse et al., 2001]. Der Stress-induzierte Anstieg der Temperatur ist zentral reguliert und unabhängig von der Umgebungstemperatur [Oka et al., 2001]. Handling und Fixierung induzieren ebenso eine akute Stressantwort mit einem Anstieg von Herzfrequenz und Körpertemperatur [Meijer et al., 2007]. Auch zur Erkennung milder bis moderater post-operativer Schmerzen ist die durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems ansteigende Herzfrequenz und Temperatur ein guter Indikator [Arras et al., 2007a]. Dieser Level an Schmerz konnte laut einer Studie von Arras nur telemetrisch und nicht durch Beobachten der äußeren Erscheinung und des Verhaltens erkannt werden, war aber durch Verabreichen eines Analgetikums reduzierbar.

Das Gewicht des Transmitters von 1,6 g und das relativ große Volumen von 1,1 cm<sup>3</sup> verglichen mit einer 25 g Maus werfen die Frage auf, ob das Tragen per se eine Belastung für die Maus darstellt. Laut Untersuchungen von Baumans et al. ist jedoch nach einer zweiwöchigen Erholungsphase das Wohlbefinden der transmittierten Tiere nicht mehr beeinträchtigt [Baumans et al., 2001]. Selbst nach Implantation eines größeren Transmittermodells mit 3,7 g und 1,75 cm<sup>3</sup> konnte bereits nach einer Woche ein normaler zirkadianer Temperaturverlauf bei B6 Mäusen beobachtet werden [Leon et al., 2004].

## 2.3 Stress und Belastung von Mäusen

Das Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 äußert in §1 folgenden Grundsatz: «Zweck dieses Gesetzes ist es, aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen.

---

<sup>1</sup>Bericht der Arbeitsgruppe „Schmerz und Distress“ der Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA), bestätigt von FELASA Board of Management im November 1992. Der Bericht „Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs“ ist erschienen in *Laboratory Animals* (1994) 28, 97-112. Übersetzt mit Genehmigung der FELASA im Auftrag des Ausschusses für tiergerechte Labortierhaltung der Gesellschaft für Versuchstierkunde.



---

Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen.»<sup>2</sup>

### 2.3.1 Definitionen

#### Schmerz

Die International Association for the Study of Pain hat 1979 folgende Definition veröffentlicht: «Schmerz ist eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die im Zusammenhang steht mit tatsächlicher oder potentieller Schädigung oder in Form einer solchen Schädigung beschrieben wird» [GV-SOLAS, 1992].

#### Distress

Die Guideline for the Recognition and Assessment of Pain in Animals (UFAW 1989) definieren Distress wie folgt: «Distress ist ein Zustand, in dem das Tier einen beträchtlichen Teil seiner Anstrengungen bzw. seiner Ressourcen adaptiven Reaktionen widmen muss, die darauf gerichtet sind, der Herausforderung einer bestimmten Umweltsituation zu begegnen». Die Arbeitsgruppe der GV-SOLAS wertet Diskomfort als milde Form von Distress [GV-SOLAS, 1992].

#### Leiden

Die Arbeitsgruppe der GV SOLAS definiert Leiden als einen speziellen Gemütszustand, der nicht mit Schmerz oder Distress gleichgesetzt werden darf, aus diesen beiden Einflüssen aber herrühren kann. Dies ist dann der Fall, wenn durch ausreichende Intensität und/oder Dauer die Toleranzgrenze eines Tieres überschritten wird. Um Leiden zu verhindern, muss also Schmerz und Distress auf ein Maß reduziert werden das von dem jeweiligen Tier tolerierbar und bewältigbar ist [GV-SOLAS, 1992].

## 2.4 Blutentnahme bei Versuchstieren

### 2.4.1 Allgemeine Aspekte

Blutentnahmen sind in den meisten Versuchsanordnungen eine unabdingbare Maßnahme und, verbunden mit den technischen Schwierigkeiten, eine Belastung für kleine Versuchstiere. Je nach Fragestellung und persönlicher Expertise stehen mehrere Techniken und Entnahmestellen zur einmaligen oder mehrmaligen Blutentnahme zur

---

<sup>2</sup>Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 8 Absatz 13 des Gesetzes vom 3. Dezember 2015 (BGBl. I S. 2178) geändert worden ist.

Verfügung. Hierzu haben die Gesellschaft für Versuchstierkunde und die Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz (TVT) eine gemeinsame Empfehlung bezüglich Lokalisationen, Ausführung, Entnahmевolumina und Häufigkeiten herausgegeben [GV-SOLAS, 2009]. Sie machen deutlich, dass grundsätzlich jener Blutentnahmetechnik der Vorrang zu geben ist, die mit dem geringsten Stress verbunden ist. Dies stellt jeden Experimentator vor die Herausforderung einer Entscheidung. Aktuell gibt es hierzu in der Literatur jedoch kaum Daten, die die Belastung durch die verschiedenen Blutentnahmeformen objektiv aufzeigen.

Viele Autoren diskutieren die Eignung, Durchführung und Vorteile einzelner Entnahmeformen [Forbes et al., 2010, Golde et al., 2005, Diehl et al., 2001, Hoff, 2000, Hem et al., 1998]. Andere beschäftigen sich ausführlich mit den biologischen Effekten, die durch den Blutverlust entstehen [McGuill and Rowan, 1989]. Wieder andere versuchen an Hand objektiver Blutparameter den Stress zu quantifizieren [Aasland et al., 2010, Schlichting, 2010]. So hat Schlichting neben der Gesamtdauer der Blutentnahme auch die Stressbelastung durch die verschiedenen Formen der Blutentnahme anhand eines Open-Field-Tests und der Bestimmung der Kortikosteronkonzentration in einer zweiten Blutentnahme untersucht.

Dennoch bleibt die Frage offen, ob es eine Belastung durch die Blutentnahme gibt die über die Fixierung per se hinausgeht und über welchen Zeitraum der Stress anhält. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Belastung durch verschiedene Formen der Blutentnahme, verglichen mit der jeweiligen alleinigen Fixierung, telemetrisch aufzuzeichnen und zu beurteilen. In den seltensten Fällen stehen einem jedoch uneingeschränkt alle von der GV-SOLAS empfohlenen Entnahmetechniken zur Verfügung. Die Anforderungen an das Blut variieren je nach Experiment: Wird arterielles, venöses oder Mischblut benötigt? Ist steriles oder unsteriles Blut erforderlich? Welches Volumen ist notwendig? Wie häufig soll Blut entnommen werden? Ist eine finale Blutentnahme geplant? Diese und weitere Fragen grenzen die Methodenwahl häufig in der Praxis ein. Je nach Fragestellung gibt es mehr oder weniger geeignete Entnahmetechniken.

Das reale Blutvolumen bei allen Säugetieren entspricht etwa 8 % der Körpermasse [Foster et al., 2014]. Eine Entnahme von 10 % dieses Volumens wird ohne Komplikationen toleriert, erfordert aber eine Erholungsphase von mindestens 2 Wochen bis zur erneuten Blutentnahme. Bei täglicher Blutentnahme darf nur 1 % des Blutvolumens entnommen werden, auch hier ist nach zwei Wochen eine Pause einzulegen [GV-SOLAS, 2009].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Techniken untersucht, die alle zur täglichen bzw. wöchentlichen wiederholten Blutentnahme bei der Maus geeignet sind [GV-SOLAS, 2009]. Bei der Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus, der Vena facialis und der Schwanzvene ist die Gewinnung größerer Blutmengen möglich, die Vena saphena ist nur für kleinere Blutmengen geeignet. Bei allen vier Entnahmetechniken schätzt die GV SOLAS in ihrer Empfehlung die Belastung als gering bis mäßig

und unter einem Tag Dauer ein. Diese Einschätzung deckt sich mit der Stresshormonbestimmung von Schlichting [Schlichting, 2010]. Es ist allgemein bekannt, dass unterschiedliche Mausstämme abweichende Verhaltensweisen oder Reaktionen an den Tag legen [Weiss et al., 2014, Belzung and Griebel, 2001, Crabbe et al., 1999, Mogil et al., 1999, Crawley et al., 1997]. Um den Einfluss dieser genetischen Unterschiede zu erfassen, werden zwei Blutentnahmetechniken (Entnahme aus der Vena facialis und aus der Schwanzvene) außer an B6 zusätzlich auch an BALB/c Mäusen durchgeführt.

## 2.4.2 Blutentnahme aus der Vena saphena

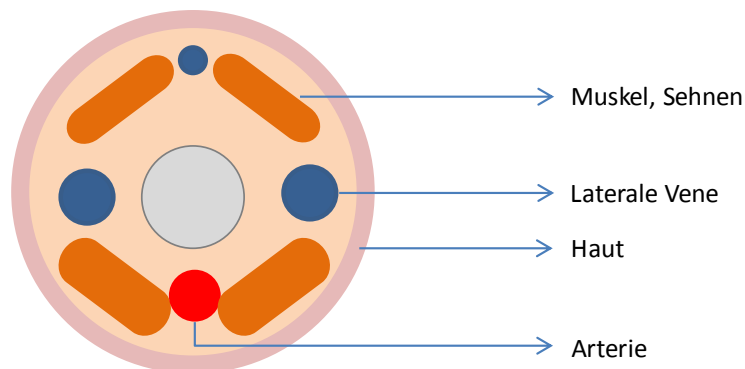
Die Blutentnahme aus der V. saphena ist eine von der Gesellschaft für Versuchstierkunde empfohlene Lokalisation zur mehrmaligen Gewinnung kleinerer Blutmengen bei der Maus [GV-SOLAS, 2009]. Nach Rasur am medialen Oberschenkel ist bereits im ungestauten Zustand die V. saphena unter der Haut sichtbar. Ein leichter Druck oberhalb des Kniegelenks streckt das Bein und staut gleichzeitig die Vene. Eine Kompression der Punktionsstelle führt zum Sistieren der Blutung.

Hem et al. zeigten, dass es sich um eine schnelle und zuverlässige Methode handelt, bei der innerhalb von 24 Stunden 10 Blutproben an derselben Stelle gewonnen werden konnten. Die von ihnen vorgeschlagene Fixierung in einem Falcon-Tube macht eine Narkose und den damit verbundenen Stress, wie von van Herck bei Ratten beobachtet, überflüssig und reduziert die Zeit, die zur Blutentnahme benötigt wird [van Herck et al., 2001, Hem et al., 1998]. Durch das alleinige Entfernen des Schorfs an der Punktionsstelle kann der Blutfluss wieder initialisiert werden ohne erneut punktieren zu müssen [Aasland et al., 2010, Hem et al., 1998]. Schlichting kommt in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass die Blutentnahme aus der V. saphena zu den am vermeintlich geringsten stressverursachenden Methoden zählt [Schlichting, 2010]. Diese Einschätzung bestätigt auch Aasland, der bei der Blutentnahme aus der V. saphena signifikant niedrigere Blutglukosewerte als nach Punktion der Schwanzvene als Stressindikator nachweisen konnte [Aasland et al., 2010]. Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe zeigten bei Messung des Serum-Kortikosteronlevels 20 Minuten nach der Blutentnahme deutlich erhöhte Werte [Madetoja et al., 2009]. Verglichen mit einer Blutentnahme am Schwanz und einer Punktion der Vena facialis war die Blutentnahme aus der V. saphena hier die stressvollste Methode. Anzumerken ist, dass im Unterschied zu anderen Durchführungen die Tiere in diesem Fall aber vor der Blutentnahme für 5 Minuten erwärmt wurden. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit hat Ziegler die histologischen Veränderungen nach verschiedenen Blutentnahmemethoden untersucht [Ziegler, 2012]. Rückschlüsse und Empfehlungen sind auf Grund der unterschiedlichen Gewebezusammensetzung und Heilungstendenzen schwierig. Tendenziell zeigt sich jedoch, dass die meisten histologischen Veränderungen sowohl nach einer Stunde als auch nach 14 Tagen bei Blutentnahme aus der V. saphena auftraten (verglichen mit einer Blutentnahmen aus dem retrobulbären Venenplexus, der Schwanzvene, der V. facialis und

dem Venenwinkel) [Ziegler, 2012].

### 2.4.3 Blutentnahme aus der Schwanzvene

Diese Form der Blutentnahme ist sowohl für Mäuse als auch für Ratten geeignet. Durch Punktion einer der beiden lateralen Schwanzvenen lässt sich bei leichter Stauung am Schwanzansatz auch eine größere Menge Blut entnehmen. Hierfür ist die Maus in einem Restraîner fixiert, eine Hyperämisierung des Schwanzes führt zu erweiterten Blutgefäßen und erleichtert so die Blutentnahme. Diese Dilatation der Schwanzvenen kann durch lokale Wärmeanwendung erzielt werden [GV-SOLAS, 2009]. Empfohlen wird die Blutentnahme im letzten Drittel des Schwanzes, da hier das muskuloskeletale System kleiner wird und die Blutgefäße prominenter in Erscheinung treten [Staszyk et al., 2003]. Neben der ventral verlaufenden Arterie und den schon seit längerem bekannten beiden größeren kollateralen Venen konnte Staszyk in histologischen Untersuchungen noch eine weitere kleinere dorsale Vene im Rattenschwanz identifizieren (vgl. Abbildung 2.1). Über eine entsprechende Vene in der Maus herrscht aktuell noch Unklarheit.



**Abbildung 2.1 :** Darstellung der Schwanzvenen bei der Ratte im Querschnitt (modifizierte Abbildung nach Staszyk et al. 2003)

Untersuchungen der Blutglukosekonzentration nach Blutentnahme zeigen einen signifikant höheren Glukosespiegel bei Entnahmen aus der Schwanzvene verglichen mit einer Blutentnahme aus der Vena saphena [Aasland et al., 2010]. Da stressinduziert die Kortikosteronkonzentration ansteigt, wird als Folge die Glukoneogenese verstärkt und die Insulinsekretion gehemmt, sodass es zu einem Anstieg der Plasmaglukose kommt. Dies impliziert einen höheren Stress bei Punktion der Schwanzvene, der laut Aasland möglicherweise durch die vorangegangene Erwärmung zur Vasodilatation bedingt sein könnte. Betrachtet man die Kortikosteronlevel im Blut, induziert die Blutentnahme aus der Schwanzvene höhere Konzentrationen als aus der Vena saphena, liegt jedoch unter den Werten die sich aus einer Punktion der Vena facialis ergeben [Schlichting, 2010]. Im Open-Field-Test zeigten die Tiere, verglichen mit

denen nach Punktion der Vena saphena, ein hyperaktives Verhalten. Eine mögliche Erklärung liegt in der deutlich verlängerten Durchführungszeit verglichen mit allen anderen Blutentnahmemethoden [Schlichting, 2010]. Bei Untersuchungen von Madetoja zum Kortikosteron- und ACTH-Level stellt sich die Punktion der Schwanzvene jedoch als am wenigsten stressvoll verglichen mit der Blutentnahme aus der V. saphena oder V. facialis dar [Madetoja et al., 2009].

## 2.4.4 Blutentnahme aus der Vena facialis

Die Blutentnahme aus der Vena facialis ist ausschließlich bei Mäusen möglich und erfordert weder eine Fixationsapparatur noch eine Narkose [GV-SOLAS, 2009]. Die Punktion erfolgt 3-4 mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer, an dem die orbitale Vene, die Vena submandibularis und andere Venen zusammenfließen und die Vena jugularis bilden [GV-SOLAS, 2009, Golde et al., 2005, Popesko et al., 1990].

Wie bei anderen Blutentnahmeformen auch ist für die sichere und schnelle Durchführung ein ausreichendes Training erforderlich, da es stammspezifische Unterschiede bezüglich der Punktionsstelle gibt und auch vereinzelt Todesfälle durch zu lang anhaltendes Stauen auftreten können. Eine korrekte Fixierung im Nackengriff zieht die Gesichtshaut zurück und führt gleichzeitig bereits zu einer Stauung der Venen, dies ist Voraussetzung für den Erfolg der Methode. So können große Blutmengen (bis zu 300 µl) gewonnen werden [GV-SOLAS, 2009]. Auch Golde lobt diese Methode als humane, schnelle Alternative ohne Anästhesie zur mehrmaligen Blutentnahme bei größeren Tiergruppen [Golde et al., 2005]. Auch bei einem sehr geübten Experimentator kann es durch Punktion mit einer Kanüle oder einem Skalpells zur Verletzung tieferer Strukturen kommen, da wenig Kontrolle über die Einstichtiefe besteht. Um eine optimale Einstichtiefe zu gewährleisten, wurde von ihnen als Alternative zu Skalpell oder Kanüle eine spezielle Lanzette entwickelt. Diese sterile Einmallanzette begrenzt die Einstichtiefe auf 5 mm und reduziert Gewebeschaden und Schmerzen [Golde et al., 2005]. Auch die Gesellschaft für Versuchstierkunde sieht diese Lanzette als Methode der Wahl an. Eine retrospektive Untersuchung von Forbes zeigte eine Mortalitätsrate von 1 % (4 von 490 Prozeduren), die durch fehlende Hämostase nach der Punktion entstand [Forbes et al., 2010]. Laut einer Studie von Madetoja zeigt sich, dass der Kortikosteronlevel und somit der Stress durch Punktion der V. facialis größer verglichen mit Punktion der Schwanzvene, aber kleiner als nach Punktion der V. saphena ist [Madetoja et al., 2009]. Schlichting belegt an Hand ihrer Untersuchungen im Open-Field-Test und der Plasmakortikosteronlevel, dass die Maus durch Punktion der Vena facialis mehr Stress und Schmerzen hat als bei den anderen drei hier beschriebenen und untersuchten Methoden [Schlichting, 2010].

## 2.4.5 Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus

Die Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus ist eine seit geraumer Zeit weltweit genutzte Methode. Auch mit dieser Methode können schnell große Volumina Blut gewonnen werden. Hierfür muss sich das Tier kurzzeitig in Vollnarkose (z.B. einer Inhalationsnarkose mit Isofluran) befinden. Man punktiert den Venenplexus, indem man eine nicht abgebrochene und, wegen der Gefahr des unerwünschten Nachblutens, nicht heparinisierte Kapillare unter Druck mit rotierenden Bewegungen im inneren Augenwinkel in Richtung gegenüberliegendes Kiefergelenk vorschiebt [GV-SOLAS, 2009]. Mittels Kapillarkraft strömt das Blut aus den verletzten Venengefäßen in die Kapillare. Nach Empfehlung der GV SOLAS sollte bei Mäusen der Außendurchmesser der Kapillare nicht größer als 0,8 mm sein und zwischen einer wiederholten Blutentnahme am selben Auge mindesten zwei Wochen Abstand liegen. Falsche Technik oder Abwehrbewegungen durch unzureichende Anästhesie können zu Entzündungen, Hornhautschäden oder Blindheit führen [Hoff, 2000]. Insbesondere die Routine und Erfahrung der durchführenden Person haben einen großen Einfluss auf eventuelle Komplikationen [van Herck et al., 1998].

Messungen der Blutglukosekonzentration zeigten, dass es nach retrobulbärer Blutentnahme zu einem dramatischen Anstieg der Konzentration kam, was von den Autoren als deutliche Stressantwort gewertet wird [Christensen et al., 2009]. Durch histologische Untersuchungen der Orbita bei Ratten wurde erkannt, dass unmittelbar durch die Punktion Gewebeschäden entstehen, die spätestens nach 4 Wochen ohne sichtbare Narben ausheilen [van Herck et al., 1992]. Ziegler hat im Rahmen ihrer Doktorarbeit die histologischen Veränderungen nach mehreren Blutentnahmeformen untersucht. Vergleicht man die Veränderungen der einzelnen Gruppen, sieht man, dass die retrobulbäre Blutentnahme mit dünner Kapillare und in Narkose mit den geringsten histologisch erfassbaren Veränderungen einhergeht [Ziegler, 2012]. Bei Vergleichen des Verhaltens von Ratten nach Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus, der Vena saphena und der Schwanzvene konnten keine Unterschiede im Bezug auf Bewegung, Inaktivität und Putzverhalten festgestellt werden [van Herck et al., 2001, van Herck et al., 2000]. Deutliche Unterschiede gab es hingegen bei der jeweils benötigten Zeit zum Gewinnen eines Volumens von 0,5 ml Blut. Die retrobulbäre Blutentnahme war siebenmal schneller als die Punktion der V. saphena und fünfzehnmal schneller als die Blutentnahme an der Schwanzvene [van Herck et al., 2001, van Herck et al., 2000]. Auch die telemetrisch gemessene Herzfrequenz und Körpertemperatur während der Blutentnahme zeigte keinen Unterschied bei Punktion des Venenplexus verglichen mit der alleinigen Anästhesiekontrolle bei Ratten [van Herck et al., 1997]. Basierend auf den gemessenen Kortikosteronwerten und dem Verhalten im Open-Field-Test schlussfolgert Schlichting, dass die retrobulbäre Blutentnahme und die Blutentnahme aus der Vene saphena zu den am vermeintlich geringsten Stress verursachenden Methoden

zählen [Schlichting, 2010].

## 2.5 Kennzeichnung von Versuchstieren

### 2.5.1 Allgemeine Aspekte

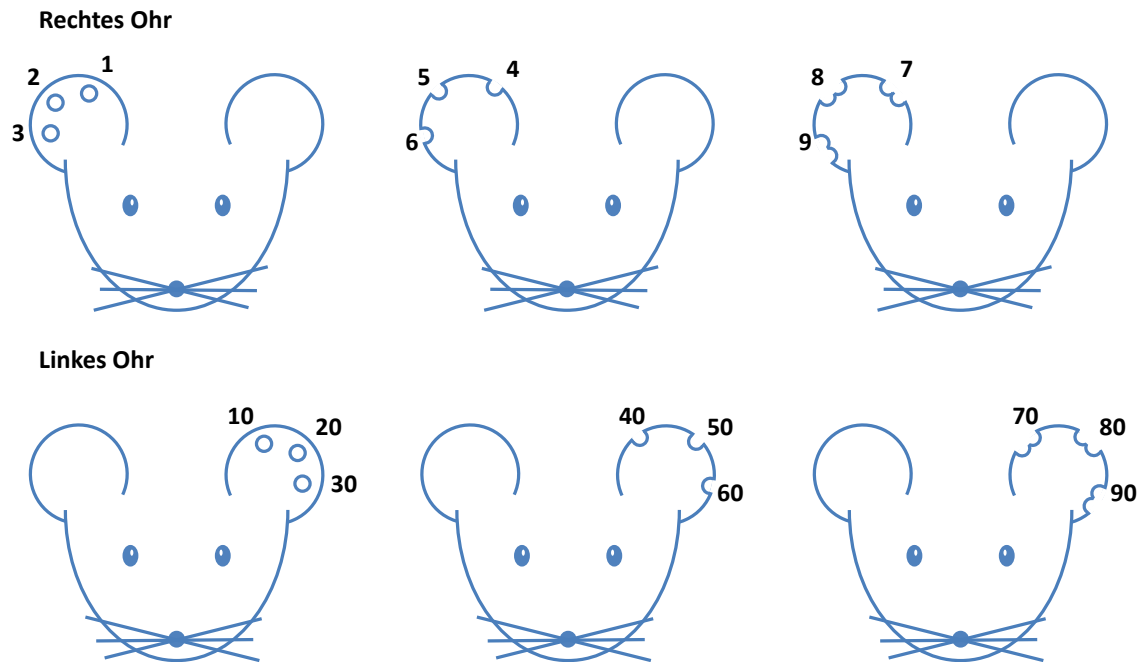
Mäuse sind soziale Tiere, die in Gruppen gehalten werden sollten, um ihrer natürlichen Lebensweise gerecht zu werden. Um auch in Gruppenhaltung eine eindeutige Identifizierung der einzelner Mäuse zu gewährleisten, ist ihre Kennzeichnung zwingend notwendig. Für kurzfristige Unterscheidungen kann man das Fell, die Ohren oder den Schwanz mit einem wasserfesten Stift bemalen oder bestimmte Areale scheeren. Sowohl für komplexe Zuchtschemata als auch zur Tieridentifikation in Versuchen ist es allerdings häufig notwendig, große Gruppen an Mäuse permanent zu markieren. Dies kann prinzipiell durch Ohrlochung, Ohrmarke, Implantation von Mikrochips oder Tätowierungen erfolgen. Eine optimale Identifizierungsmethode sollte leicht anzubringen, einfach zu lesen und harmlos für das Tier sein sowie keine potenziellen Interferenzen mit Experimenten oder dem Interpretieren von Daten verursachen [New, 1978].

In die Entscheidung, welcher Methode der Vorzug zu geben ist, fließt neben rechtlichen Vorschriften, wirtschaftlichen Erwägungen und wissenschaftlichen Anforderungen auch die mögliche Belastung ein. Aktuell gibt es in der Literatur jedoch kaum Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Markierungstechniken auf das Wohlbefinden der Tiere. Ziel unserer Untersuchungen ist es, telemetrisch die Stressbelastung durch das Anbringen, Auslesen und Tragen von Markierungen zu bestimmen. Dabei werden Ohrlochung, Metallohrmarke, RapID Ohrmarke und p-Chip über einen Zeitraum von vier Wochen miteinander verglichen.

### 2.5.2 Kennzeichnung mittels Ohrlochung

Markierungen an der Pinna des Ohres können bei Mäusen bereits in einem Alter von zwei Wochen ohne Anästhesie angebracht werden. Erfolgt die Ohrlochung an festgelegten Arealen der Ohrmuschel, können ca. 100 Tieren sicher voneinander unterschieden werden. Hierzu werden die Nummern 1 bis 9 in einem Ohr und 10 bis 90 am anderen Ohr durch gezielte Positionierung von Ohrlöchern oder von Ohrkerben verankert und die Zahlen durch Kombination aus rechtem und linkem Ohr zusammengesetzt.

Vorteilhaft sind neben der schnellen und einfachen Durchführung, der geringe Kostenaufwand, die Abwesenheit von Fremdkörpern am Tier und die Möglichkeit, das anfallende Ohrgewebe gleich zur Genotypisierung zu verwenden. Durch Kämpfe zwischen einzelnen Mäusen oder einer guten Wundheilung kann aber die Identifizierung nach einigen Wochen erschwert werden oder sogar nicht mehr eindeutig lesbar



**Abbildung 2.2 :** Standardmuster für die Ohrlochung/-kerbung zur Nummerierung von Mäusen (modifiziert nach Hedrich 2012)

sein [Hedrich, 2012]. Die Ohrlochung ist schmerzhaft und erfordert eine gute Fixierung der Maus. Die Kombination aus beidem kann zur Beeinträchtigung der Tiere führen. Es ist anzunehmen, dass die Wahl der Ohrlochzange entscheidend für die Schmerzhaftigkeit beim Markieren ist. Die Markierung ist prinzipiell auch aus der Ferne lesbar, in der Regel müssen die Mäuse jedoch zum Ablesen gefangen und aus dem Käfig geholt werden. Eine Fixierung im Nackengriff ist in der Regel aber nicht nötig [Dahlborn et al., 2013]. Cinelli et al. beobachteten, dass die Ohrlochung, die sie im Rahmen von Biopsieentnahmefethoden untersuchten, nicht mit signifikanten Unterschieden in Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität verglichen mit lediglich fixierten Mäusen verbunden ist [Cinelli et al., 2007]. Der Anstieg der Parameter normalisierte sich wieder nach einer Stunde. In einer telemetrischen Studie zu Blutdruck und Herzfrequenz bei Ratten, zeigte sich während der ersten Stunde nach der Ohrlochung ein stärkerer Anstieg beider gemessener Parameter im Vergleich zu einer Zehentätowierung [Kasanen et al., 2011]

### 2.5.3 Kennzeichnung mittels Ohrmarke

Im Unterschied zur Ohrlochung können durch Metallohrmarken bis zu 10.000 Tiere individuell gekennzeichnet werden. Es handelt sich um eine einfache Methode die ohne Anästhesie angewendet wird. Wichtig ist der korrekte Sitz an der Ohrmuschel um ein Abknicken des Ohres zu vermeiden. Auch wenn die Pinna bereits im Alter von zwei



Wochen entwickelt ist, kann das Ohr erst um den Zeitpunkt des Absetzens mit drei Wochen das Gewicht der Ohrmarke tragen. Die Ohrmarken sind fortlaufend nummeriert und werden versuchs- und stammübergreifend eingesetzt. Teilweise verlieren Mäuse ihre Ohrmarken, was ein Verlust der Identifizierung bedeutet. Die Ohrmarken bestehen häufig aus nickelhaltigen Metalllegierungen, die Allergien hervorrufen können. Nach einer Entscheidung der Schweizer Behörden im Jahr 2010 ist in der Schweiz die Nutzung von Metallohrmarken bei kleinen Labornagern nicht mehr gestattet <sup>3</sup>. Die Tiere müssen sowohl zur Anbringung als auch zum Ablesen der Ohrmarke mittels Nackengriff fixiert werden.

Vorteilhaft sind die einfache Anwendung, die geringen Kosten und die große Anzahl an Nummerierungen. Von Nachteil ist das hohe Risiko des Verlustes, die Gefahr der Entstehung einer entzündlichen Reaktion oder gar einer Neoplasie sowie die Notwendigkeit zur Entfernung vor z.B. MRT- oder CT- Untersuchungen. Cover et al. beobachteten in einer pharmakologischen Studie nach einem Jahr Dermatitis (bis zu 40 %) und tödliche verlaufende Septikämien (ca. 14 %), die durch eine systemische *Staphylococcus aureus* Infektion bedingt waren [Cover et al., 1989]. In dieser Studie konnte die ohrmarkentragende Ohrmuschel eindeutig als Eintrittspforte identifiziert werden. Auch Kitagaki zeigte, dass bei Nutzung von Metallohrmarken nach 26 Wochen ein erhöhtes Risiko einer Reaktion bzw. Infektion des Ohrgewebes in C57BL/6 Mäusen besteht [Kitagaki and Hirota, 2007]. Im Laufe einer anderen Studie entwickelten über einen Beobachtungszeitraum von 25 Monaten 8,8 % aller FVB/N Mäuse ein Plattenepithelkarzinom am ohrmarkentragenden rechten Ohr, während am linken Ohr kein Tumor auftrat [Baron et al., 2005].

## 2.5.4 Kennzeichnung mittels RapID

Eine Alternative zur herkömmlichen Kennzeichnung am Ohr bietet derzeit die RapID, eine kleine Plastikohrmarke mit einem 2D-Barcode, die ebenfalls an der Pinna befestigt wird. Durch diese Form der Codierung können über eine Million individuelle Ohrmarken kreiert werden. Durch unterschiedliche Farben des Plastiks kann zusätzlich bereits eine optische Kennzeichnung erfolgen. Zum Setzen ist ein spezieller Applikator notwendig, das Lesen erfolgt mittels Laser und wird direkt in eine digitale Form überführt. Für beides muss die Maus im Nackengriff fixiert werden. Ein Vorteil ist, dass die Ohrmarke durch ihre geringe Größe (5 x 5 mm) komplett in der Ohrmuschel sitzt und ein Verlust, zum Beispiel durch Hängenbleiben der Schlaufe am Gitter, deutlich reduziert wird. Durch ihr leichtes Gewicht (< 0,07 g) kommt es kaum zu Irritationen und daraus entstehenden Entzündungen. Die Anbringung ist schnell und einfach und erfordert keine Anästhesie. Plastik als biologisch inertes Materi-

---

<sup>3</sup>Verordnung des BVET vom 12. April 2010 über die Haltung von Versuchstieren und die Erzeugung gentechnisch veränderter Tiere sowie über die Verfahren bei Tierversuchen (Tierversuchsverordnung; SR 455.163; TVV)

al verhindert Reaktionen des umliegenden Gewebes und ist zudem MRT kompatibel (Herstellerangaben). Von Nachteil ist jedoch der hohe Preis sowohl für die Ohrmarken als auch für die Anschaffung der Laser (4,36€ pro Maus im Starter-Set, November 2014). Wissenschaftliche Publikationen im Zusammenhang mit RapID Ohrmarken sind bisher noch nicht erschienen.

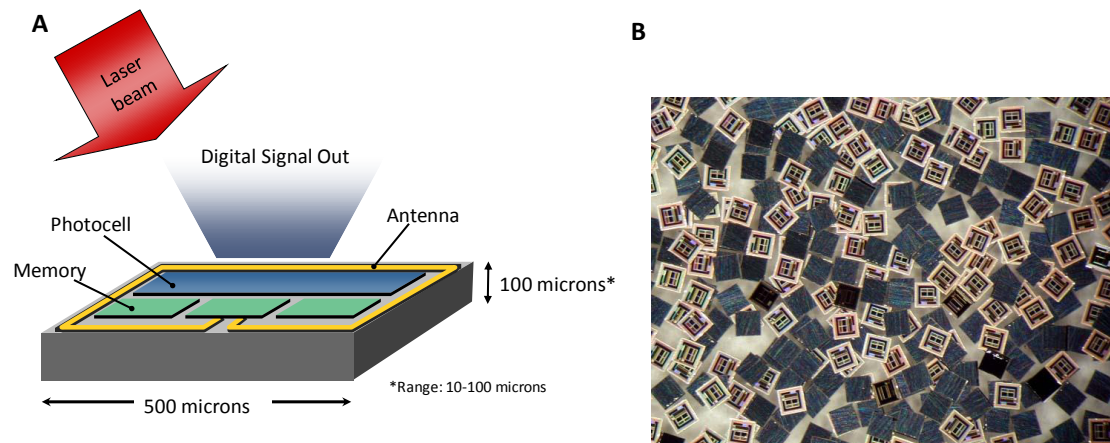


**Abbildung 2.3 :** RapID Tag™ (Copyright © RapID Lab)

### 2.5.5 Kennzeichnung mittels p-Chip

Die Kennzeichnung mit dem Mikrotransponder p-Chip ist eine neue auf Radiowellen basierende Methode, die von Gruda 2010 zum ersten Mal publiziert wurde [Gruda et al., 2010]. Grundlage sind die seit den späten 1980ern erwerbbaaren RFID (radio-frequency identification) Transponder, die subkutan implantiert werden können. Eine Weiterentwicklung dieser Technik ist der sehr schmale Mikrotransponder der, aktiviert durch Laserlicht, eine Seriennummer an den angeschlossenen Computer sendet. Es sind  $10^{15}$  verschiedene Codierungsmöglichkeiten gegeben. Dieser Mikrotransponder besitzt eine Größe von  $600 \times 600 \times 100 \mu\text{m}$  sowie ein Gewicht von  $85 \mu\text{g}$  und kann deshalb subkutan im Ohr oder im Schwanz implantiert werden. Eine Applikation an der lateralen Seite des Schwanzes ist jedoch vorzuziehen, da sie verglichen mit einer Anbringung im Ohr ohne Kurznarkose und somit schneller erfolgen kann (durchschnittliche Dauer der Applikation: 53 sec am Schwanz und 5,4 min am Ohr) [Gruda et al., 2010]. Zur Implantation im Schwanz muss die Maus lediglich entsprechend fixiert werden. Der p-Chip wird mit einer 21 G Nadel injiziert. Ein innenliegender Stab (27 G) schiebt den Chip vor und platziert ihn unter der Haut. Die bevorzugte Lokalisation ist seitlich am Schwanz, oberhalb der prominenten lateralen Vene und ca. 1 bis 1,5 cm distal des Schwanzansatzes. Zum Ablesen muss die Maus ebenfalls fixiert werden, sodass man ohne Probleme mit dem Laser die entsprechende Stelle am Schwanz erreichen kann. Hierfür ist es vorteilhaft, den Chip stets an selber Seite

und Stelle zu platzieren. In Versuchen konnte der Hersteller den Chip bereits ab Tag 15 erfolgreich implantieren. Es zeigte sich, dass der p-Chip auch in pigmentierten Mäusen (C57BL/6J) problemlos abzulesen war. Die silikonbeschichtete Oberfläche ist biologisch inert und induziert nur minimale Gewebereaktion [Gruda et al., 2010].



**Abbildung 2.4 :** A: Aufbau und Funktionsweise des p-Chips, B: Ober- und Unterseite mehrere p-Chips (Copyright © PharmaSeq)

Die Handhabung ist schnell erlernbar und zügig durchzuführen. Fehler bei der Identifizierung sind kaum zu erwarten. Die Kosten beliefen sich zum Bestelldatum (Dezember 2014) auf 4,23 € pro Chip ohne Anschaffung des Lesegeräts. In der Vergangenheit beschrieben mehrere Autoren eine signifikant erhöhte Tumorzinzidenz im Bereich von Transpondern sowohl bei Mäusen als auch bei Ratten [Le Calvez et al., 2006, Tillmann et al., 1997]. Langzeituntersuchungen zu diesem Chip laufen noch; bisher konnten nach fünfmonatigem Tragen keine Auffälligkeiten beobachtet werden [Gruda et al., 2010]. Weitere wissenschaftliche Untersuchungen oder Publikationen zum p-Chip waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht erfolgt.

## 2.6 Langzeitbelastung durch Routineprozeduren

Es ist offensichtlich und auch vom Gesetzgeber klar erkannt, dass invasive Eingriffe Stress und Belastung auslösen. Der Alltag vieler Versuchstiere ist jedoch von nicht-invasiven Routineprozeduren geprägt, die potentiell ebenfalls Stressoren darstellen. Dies können zum Beispiel häufiger Personenverkehr im Raum sein, Reinigungsarbeiten, spezielle Diäten, Käfigwechsel, Wiegen, klinische Untersuchungen, Wechsel der Gruppenzusammensetzung im Käfig und vieles andere. Es besteht die Möglichkeit, dass die Mäuse darauf instinktiv mit Stress reagieren, unabhängig davon wie

gut oder sorgfältig die Maßnahme abläuft. Nach ausführlicher Literaturrecherche von Balcombe et al. zum Thema Messung und Quantifizierung von Schmerz und Stress bei Tieren nach Handling, Blutentnahme und Schlundsondierung zeigte sich ein eindeutiger Trend [Balcombe et al., 2004]. Änderungen physiologischer Parameter (Kortikosteron, Glukose, Wachstumshormone, Herzfrequenz, Blutdruck und Verhalten) traten bei mehreren Spezies auf und wurden in den Studien einheitlich berichtet. Die Zusammenfassung von Balcombe demonstriert, dass die Tiere mit einer charakteristischen und statistisch signifikanten Stressantwort auf alle drei Manipulationen reagieren. Die Arbeitsgruppe kommt zum Schluss, dass sämtliche Laborroutine mit Stress assoziiert ist [Balcombe et al., 2004].

Anders als bei Ratten kommt es bei Mäusen auch langfristig zu keiner vollständigen Gewöhnung an das Handling [Kramer et al., 2004]. Es zeigte sich jedoch nach einer zweiwöchigen Gewöhnungs- und Konditionierungsphase bei B6 Mäusen, eine signifikante Reduzierung der Stressantwort. Ausgenommen hiervon war das erste Betreten des Raumes zu Beginn der Helligkeitsperiode. Trotz oben beschriebener Reduzierung ist dennoch offensichtlich zu sehen, dass sich auch nach zwölf Tagen Handling ein signifikanter Herzfrequenzanstieg von „vorher“ zu „nachher“ zeigt [Balcombe et al., 2004, Kramer et al., 2004]. Deshalb muss man annehmen, dass Mäuse auch wiederholtes Handling als milden Stressor wahrnehmen [Meijer et al., 2007]. Harkin untersuchte bei Ratten den Einfluss verschiedener Umwelteinflüsse auf die Stressantwort. Dabei konnte er zeigen, dass die stärkste Stressantwort mit einem deutlichen Anstieg von Herzfrequenz und Temperatur durch eine direkte Veränderung im Käfig entsteht [Harkin et al., 2002]. Auch Untersuchungen zu sozialem Stress bei Ratten im Resident-Intruder Modell zeigten einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz verglichen mit dem Normalzustand [Sgoifo et al., 1994]. Hierbei wird zu einer einzeln gehaltenen Ratte (Resident), eine weitere Ratte (Intruder) gesetzt. Bei Mäusen führt Handling ebenfalls zu einer akuten Stressantwort, die sich im Anstieg der telemetrisch gemessenen Herzfrequenz und Körperkerntemperatur widerspiegelt [Meijer et al., 2007, Clement et al., 1989]. Diese Stress-induzierte Hyperthermie durch Handling der Mäuse ist so stabil und reproduzierbar, dass sie als Methode zur Testung angstlösender Pharmaka verwendet wird [van der Heyden et al., 1997, Zethof et al., 1994]. Auch die quantitative Messung der Plasma-Kortikosteronwerte von Mäusen nach Fixierung zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, die nicht fixiert wurde [Meijer et al., 2006]. Ob ein gehäuftes und langanhaltendes Vorkommen dieser Stressoren Einfluss auf die typische Tag/Nacht-Rhythmik der Mäuse nehmen kann und welche Konsequenzen dies gegebenenfalls für Langzeitexperimente hat, ist bisher nur unzureichend untersucht. Ziel unserer Untersuchungen ist es, einen komplexen viermonatigen Tierversuch telemetrisch zu begleiten, um zu erfassen ob sich die Tag/Nacht-Rhythmik der Tiere verändert.

### 2.6.1 Experimentelle Atheroskleroseforschung

Tierversuche zur Atherosklerose sind meist durch eine längere Versuchsdauer, oft sogar über mehrere Monate, gekennzeichnet, da das atherosklerotische Krankheitsgeschehen durch die langfristige Verabreichung einer spezifischen Diät beschleunigt werden kann. Sie sind somit bestens geeignet für telemetrische Untersuchungen über längere Zeit. Der Zusammenhang von Stress und Atherosklerose wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach untersucht [Okutsu et al., 2014, Stämpfli et al., 2014, Zhang et al., 2010, Kumari et al., 2003]. Die Autoren konnten in ihren Fällen zeigen, dass Stress einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose hat. Durch die Verknüpfung von Atherosklerose mit einem chronischen Stressregime ergibt sich die Möglichkeit einen komplexen Tierversuch telemetrisch zu begleiten.

Ein Standardmausmodell der humanen Atheroskleroseforschung ist die Apoe<sup>-/-</sup> knockout Maus [Pendse et al., 2009]. Das vom Apoe Gen kodierte Apolipoprotein E sitzt in der Hüllschicht von Lipoproteinkomplexen und ist entscheidend an der Endozytose in der Leber beteiligt. Es transportiert vor allem Triglyzeride und Cholesterin. Durch Verabreichung einer fett- und cholesterinreichen Diät (sogenannte Western Diät) können umfangreiche atherosklerotische Läsionen der Aorta und der Arteria carotis in der Apoe<sup>-/-</sup> Maus induziert werden [Nakashima et al., 1994]. Fügt man dieser Fütterungsdiät noch soziale Stressoren durch phasenweise Einzelhaltung und psychologische Stressoren durch vermehrten Käfigwechsel hinzu, ergibt sich eine komplexe Versuchsanordnung. Telemetrische Messungen bei Mäusen in Einzelhaltung verglichen mit Mäusen in Paarhaltung zeigten nach Späni et al. einen Einfluss auf verschiedene physiologische Parameter. Die Herzfrequenz der einzeln gehaltenen Mäuse war signifikant höher verglichen mit den Mäusen in der Paarhaltung, begleitet von Störungen des zirkadianen Schlafrhythmus. Die Körpertemperatur hingegen war in Einzelhaltung geringgradig erniedrigt [Späni et al., 2003].

### 2.6.2 Tag/Nacht-Rhythmus

Ein ausgeprägter Tag/Nacht-Rhythmus vieler biologischer Parameter ist auch bei seit Generationen in Gefangenschaft lebenden Labormäusen sehr deutlich ausgeprägt [Hedrich, 2012]. Mäuse sind nachtaktive Tiere, die in der Dunkelphase ihre Aktivitätsperiode haben und während der Helligkeitsphase (Tag) schlafen [Weiss et al., 2014]. Gewöhnlich finden die meisten Manipulationen an Versuchstieren während unseres Arbeitsalltags statt. Sie fallen somit in die Helligkeitsphase bzw. Inaktivitätsphase der Mäuse.

Telemetrische Untersuchungen der Herzfrequenz über 24 Stunden zeigen eine signifikant erhöhte mittlere Herzfrequenz in der Dunkelperiode [Li et al., 1999]. Die graphische Darstellung der Herzfrequenz zeigt dabei eine bimodale Verteilung während der Aktivitätsphase mit einer Spitze zu Beginn und einer gegen Ende der Dunkelperiode. Ein deutlicher Tiefpunkt in der Kurve (mit niedrigeren Herzfrequenzen über längere

Zeit) befindet sich in der Mitte der Helligkeitsperiode, ein Weiterer im letzten Drittel der Dunkelperiode [Li et al., 1999]. Versuche in der Schlafforschung machten deutlich, dass ein chronisch milder Stress Auswirkungen auf die Qualität, Dauer und Häufigkeit der einzelnen Schlafphasen von Ratten hat [Papale et al., 2005, Cheeta et al., 1997]. Dieser Stress ändert bei Ratten auch den zirkadianen Aktivitätsrhythmus, mit einem vermehrten Schlaf in der Dunkelperiode [Kant et al., 1995].

## **3 Tiere, Material und Methoden**

## 3.1 Fragestellung und Methodenwahl

### 3.1.1 Fragestellung

Der objektiven und reproduzierbaren Belastungserfassung von Versuchstieren kommt eine große tierschutzrechtliche Bedeutung zu. Russel und Burch forderten bereits 1959 in ihrem Buch *The Principles of Humane Experimental Technique* neben der Reduktion und der Vermeidung von Tierversuchen auch eine Verbesserung der Versuchs- und Haltungsbedingungen für die Versuchstiere [Russell et al., 1959]. Daraus abgeleitet ergibt sich die Notwendigkeit, jeweils die schonendste versuchstierkundliche Technik zu wählen. Ziel dieser Arbeit ist es Belastungen, wie sie durch Kennzeichnung, Blutentnahme und chronischen Stress entstehen, objektiv zu erfassen und zu beurteilen, um aus den so gewonnenen Daten den Schweregrad der Belastung einschätzen zu können. Basierend auf dieser Einschätzung sollen Empfehlungen abgeleitet werden.

#### Versuch *Blutentnahme*

Hauptfrage:

- Wie belastend ist die Blutentnahme mittels unterschiedlicher Methoden (Vena saphena, Schwanzvene, Vena facialis, retrobulbärer Venenplexus)?

Detailfragen:

- Liegt eine Belastung durch die Blutentnahme vor, die über die Fixierungskomponente hinaus geht?
- Wie lange hält die Belastung an?
- Bestehen Auswirkungen auf den Tag/Nacht-Rhythmus der Mäuse?
- Sind die unterschiedlichen Formen der Blutentnahme unterschiedlich belastend?
- Wie verhält es sich mit stammspezifischen Unterschieden?

#### Versuch *Kennzeichnung*

Hauptfrage:

- Wie belastend ist die Kennzeichnung mittels unterschiedlicher Systeme (Ohrloch, Ohrmarke, RapID, p-Chip)?

Detailfragen:

- Wie belastend ist das Anbringen bzw. das Ablesen der jeweiligen Kennzeichnung?



- Wie lange hält die Belastung an?
- Bestehen langfristige Beeinträchtigungen im Tag/Nacht-Rhythmus der Tiere beim Tragen der Kennzeichnung über 28 Tage?

### Versuch *chronisches Stressmodell*

Hauptfrage:

- Haben Mäuse die über fünf Monate einem moderaten Stressregime ausgesetzt sind einen veränderten Tag/Nacht-Rhythmus?
- Beeinflusst dieser chronische Stress die Gewichtszunahme?

## 3.1.2 Methodenwahl

Eine akkurate und objektive Methode hierzu ist die telemetrische Bestimmung von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität. Die Telemetrie stellt aktuell die einzige verfügbare Technik zur Datenerhebung in frei beweglichen Tieren dar [Kretlow et al., 2010]. Durch diese Methode ist es möglich, Daten kontinuierlich und über mehrere Wochen zu erheben, wobei sich das Tier in seiner gewohnten Umgebung befindet und es keinerlei Artefakte durch den Beobachter im Raum und die Messung selbst gibt.

## 3.2 Tiere und Telemetrie

Sowohl der Entwurf als auch die Durchführung der Studie erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz (TierSchG in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006) und der Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (TierSchVersV in der Fassung vom 01. August 2013).

### 3.2.1 Tiere und Tierhaltung

#### Herkunft der Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Mausstämme verwendet. Für die verschiedenen Formen der Blutentnahme und der Kennzeichnung wurde die Inzuchtlinie C57BL/6J von Charles River Laboratories eingesetzt. Ebenso wurde die Inzuchtlinie BALB/cJRj von Janvier für zwei Methoden der Blutentnahme verwendet. Untersuchungen zum chronischen Stressmodell erfolgten in der Apolipoprotein E defizienten Mauslinie  $\text{Apoe}^{-/-}$  (offizielle Stammbezeichnung: B6129P2-Apoe<sup>tm1Une</sup>/J)

auf B6 Hintergrund aus der Zucht des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg (vergleiche Tabelle 3.1). Da eine Paarhaltung bei männlichen Tieren, auch unter Geschwistern, problematisch sein kann, wurden nur weibliche Tiere verwendet. Die B6 Mäuse wurden in einem Alter von 8-9 Wochen, die BALB/c und  $Apoe^{-/-}$  Mäuse in einem Alter von 9-10 Wochen geliefert.

**Tabelle 3.1 :** Übersicht der verwendeten Mausstämme

Stamm	Geschlecht	Bezugsquelle	Verwendung
C57BL/6J	♀	Charles River Laboratories Sulzfeld, Deutschland	Blutentnahme, Kennzeichnung
BALB/cJRj	♀	Janvier Rennes, Frankreich	Blutentnahme
$Apoe^{-/-}$ (B6129P2- $Apoe^{tm1Unc}/J$ )	♀	The Jackson Laboratory; Expansion und Zucht im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Deutschland	chronischer Stress

## Haltung der Tiere

Alle Mäuse wurden in einer Barrierenhaltung in offenen Tecniplast Typ 1145T Käfigen (369 x 156 x 132 mm; 435 cm<sup>2</sup>) im Zentrum für Präklinische Forschung des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg gehalten. Die Raumtemperatur lag bei  $22 \pm 2$  °C mit einer relativen Luftfeuchte von  $55 \pm 5$  % und mindestens 15 kompletten Wechselluft pro Stunde. Der Hell/Dunkel-Rhythmus betrug 12/12 Stunden. Die Helligkeitsphase dauerte von 7 bis 19 Uhr mit einer Intensität von mindestens 40 Lux. Den Tieren stand ad libitum pelletiertes Futter (Kliba® Nr. 3437, Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz; siehe Tabelle 3.2) und autoklaviertes Trinkwasser zur Verfügung. Als Einstreu diente entstaubtes Espenholzgranulat (Abedd®, LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich), das einmal wöchentlich gewechselt wurde. Zur Anreicherung der Umgebung wurde Nestbaumaterial ebenfalls aus Espenholz angeboten (Abedd®). Der Gesundheitszustand der Tiere wurde während der kompletten Zeit durch ein Sentinel Programm überwacht. Die Sentinel-Mäuse wurden im hausinternen Diagnostiklabor auf alle von der FELASA empfohlenen viralen, bakteriellen und parasitären Pathogene untersucht [Mähler et al., 2014]. Die Haltung der Tiere sowie die Durchführung sämtlicher Versuche fand in zwei dafür eigens ausgestatteten Tierräumen mit eingeschränktem Personenverkehr und auf ein Minimum reduzierten Störungen statt. Besucher oder nicht zum Experiment gehörende Arbeiten waren nicht gestattet. Um Einzelhaltung zu vermeiden, erhielt jede Maus nach der Implantation des Transmitters eine andersfarbige weibliche Begleitmaus. Die operierten B6 und  $Apoe^{-/-}$  Mäuse wurden mit BALB/c Weibchen vergesellschaftet, die operierten BALB/c Weibchen erhielten weibliche B6 Begleittiere.

**Tabelle 3.2 :** Inhaltsstoffe Kliba Nr. 3437

Rohprotein 18,5 %	Kalzium 10,5 g/kg	Mangan 10,0 mg/kg	Vitamin A 23000 IE/kg
Rohfaser 4,5 %	Phosphor 8,0 g/kg	Zink 21,0 mg/kg	Vitamin D3 1000 IE/kg
Rohfett 4,5 %	Natrium 2,0 g/kg	Selen 0,13 mg/kg	
Rohasche 6,3 %	Kupfer 8 mg/kg		

### 3.2.2 Tierschutzrechtliche Genehmigung

Das Versuchsvorhaben wurde vom Regierungspräsidiums Karlsruhe unter der Nummer G 59/12 sowie G 89/14 genehmigt und in Einvernehmen mit dem zuständigen Tierschutzbeauftragten ausgeführt.

### 3.2.3 Telemetrische Untersuchungen

**Telemetriesystem** Die drahtlose Biotelemetrie, die Messwerte erfasst und mittels Funkwellen überträgt, wurde zur Echtzeitmessung von Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität benutzt.

Hierzu wurde das kommerzielle Telemetriesystem der Firma DSI verwendet (Data Sciences International, St.Paul, Minnesota, USA). Jeder Maus wurde ein Transmitter vom Typ ETA-F10 implantiert, welcher eine kontinuierliche Messung oben genannter Parameter in sich frei bewegenden Tieren erlaubt.

**Tabelle 3.3 :** Technische Daten des Transmitters ETA-F10

Gewicht	1,6 g
Volumen	1,1 cm <sup>3</sup>
Messbare Parameter	Biopotential, Temperatur, Aktivität

Jeder Transmitter enthält einen magnetisch aktivierbaren Schalter der ein Einschalten sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* erlaubt. Ist die Batterie des Transmitters mittels Magnet angeschaltet worden, kann man einen hochfrequenten Ton wahrnehmen, wenn man ein AM-Radio in unmittelbare Nähe bringt. Der Transmitter nimmt mittels interner Sensoren die Informationen auf und überträgt sie durch Radiowellen auf den zugehörigen Receiver (siehe Abbildung 3.1). Dieser fungiert als Antenne, nimmt das drahtlose Signal auf und wandelt es in ein digitales Signal um bevor er es auf die Data Exchange Matrix überträgt, wo das Signal gefiltert und verarbeitet wird. Da alle Transmitter auf derselben Frequenz arbeiten, kann nur eine transmittierte Maus pro Käfig gehalten werden. Um Interferenzen und Kreuzmessungen zu vermeiden, empfängt jeder Receiver nur das auf ihn programmierte, und durch die unmittelbare Nähe zudem auch stärkste, Signal. Die DSI Software zeigt die erhobenen physiologischen Werte in Echtzeit auf dem Monitor und speichert die Daten für eine spätere Verwendung.



**Abbildung 3.1 :** Aufbau einer Telemetrieanlage (Copyright © DSI)

**Daten sammeln** Initialisiert wird das Erfassen von Daten durch ein Anschalten des Transmitters indem die Maus mit einem Magnet berührt wird. Das Ausschalten des Transmitters erfolgt auf gleichem Weg. Zur Auswertung wurde die Dataquest A.R.T. Software 4.33 Gold resp. Platinum (DSI) verwendet.

### Entstehung der einzelnen Parameter

**Herzfrequenz** Durch die Elektroden des Transmitters wird ein Elektrokardiogramm aufgezeichnet, woraus die Data Acquisition Software die Herzfrequenz errechnet. Die Anordnung entspricht der Ableitung 2 nach Einthoven [Hoffmann et al., 2014].

**Temperatur** Der Sensor im Transmitterkörper misst die Kerntemperatur und leitet sie an die Software weiter.

**Aktivität** Die Aktivität wird über die Modulation der Signalstärke gemessen und in Anzahl pro Minute (Arbitrary Unit, AU) angegeben. Änderungen der Signalstärke registriert die Data Exchange Matrix als eine Aktivität. Die generierte Aktivitätsanzahl ist sowohl von der Distanz als auch der Geschwindigkeit der Bewegung (im Bezug zu den Antennen im Receiver) abhängig. Die so gemessene Aktivität kann nicht als eine absolut zurückgelegte Wegstrecke interpretiert werden.

### Implantation des Transmitters

**Präoperative Phase** Alle Tiere wurden von Züchtern oder aus anderen Tierhaltungsbereichen in die entsprechende Haltungsbarriere geliefert. Nach Ankunft im Tierraum erfolgte eine Adaptationsphase von acht Tagen, in dieser Zeit soll eine Erholung vom Transport und eine Gewöhnung an die haltungsspezifischen Bedingungen stattfinden. Die Tiere wurden hierzu zu zweit im Käfig gehalten. Der allgemeine Gesundheitszustand und die Futter- sowie Wasseraufnahme wurden täglich kontrolliert. Bei einem Gewicht von  $20 \pm 1$  g erfolgte die Operation.

Die Transmitter (ETA-F10, DSI) wurden steril verpackt geliefert. Bevor die Implantation erfolgen konnte, mussten die Ableitungen auf eine an die Maus angepasste Länge gekürzt werden. Wie von Cesarovic beschrieben wurde unter antiseptischen Bedingungen die rote (positive) Elektrode auf 42 mm, die weiße (negative) Elektrode auf 55 mm gekürzt [Cesarovic et al., 2011]. Es wurden 20 mm der Isolierung am distalen Ende der roten Elektrode und 10 mm am Ende der weißen Elektrode entfernt. An den jetzt freigelegten Enden wurde jeweils eine Schlaufe geformt und mittels Seidenfaden fixiert (PERMA-Handseide, 6-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) (Abbildung 3.2). Der vorbereitete Transmitter wurde bis zur Implantation in steriler Kochsalz-Lösung aufbewahrt.



**Abbildung 3.2 :** Ungekürzter und gekürzter Transmitter (ETA-F10)

**Anästhesie** Die Mäuse wurden mittels einer reinen antagonisierbaren Injektionsnarkose anästhesiert [Erhardt et al., 2012]. Dazu erhielten sie intraperitoneal eine Kombination aus Midazolam (5 mg/kg KGW, Dormicum®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), Medetomidin (0,5 mg/kg KGW, Dorbene vet®, Zoetis, Berlin, Deutschland) und Fentanyl (0,05 mg/kg KGW Fentanyl®, Janssen GmbH, Neuss, Deutschland).

**Operationsvorbereitung** Die Implantation wurde unter antiseptischen Bedingungen durchgeführt. Um ein starkes Auskühlen zu verhindern, lag die Maus während der gesamten Operation auf einer Wärmematte mit  $38,0 \pm 1$  °C. Während der kompletten Narkose war die Hornhaut der Augen mittels Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Um den Flüssigkeitshaushalt zu unterstützen, wurde vor Beginn der Operation 1 ml körperwarmer 0,9 % NaCl-Lösung (NaCl 0,9 %, B.Braun, Melsungen, Deutschland) verabreicht.

**Implantation** Die Implantation des Transmitters erfolgte in Anlehnung an die von Cesarovic et al. beschriebene Operationsmethode [Cesarovic et al., 2011]. Unmittelbar nach Eintritt der Anästhesie wurde die Maus in Rückenlage verbracht und von

der Halsregion bis zum Beckeneingang rasiert und der OP Bereich desinfiziert (Kodan® Tinktur Forte, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war (Toleranzstadium III nach Guedel) erfolgte auf Höhe des Processus xiphoideus sowie an der Aperthura thoracis jeweils ein kleiner Schnitt (0,3-0,5 cm Länge). Die negative (graue) Elektrode wurde subkutan vom Sternum zum Hals getunnelt. Im Bereich des Halses wurde rechts entlang der Trachea in die Tiefe präpariert, sodass die Schlaufe der negativen Elektrode zwischen dem Musculus semispinalis capitis und Musculus semispinalis cervicis mittels zweier nicht resorbierbarer Nähte fixiert werden konnte (PERMA Handseide, 6-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Die Wundhöhle wurde durch zwei einfache Knopfnähte mit resorbierbarem Faden verschlossen (VICRYL, 6-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und die Haut anschließend geklammert (Einweg-Hautklammern, 3M Precise<sup>TM</sup>, DMM DS-15, St. Paul, Minnesota, USA). Die Bauchhöhle wurde entlang der Linea alba auf einer Länge von 1,5 cm eröffnet. Der Körper des Transmitters wurde in der Bauchhöhle platziert, die Schlaufe der positiven (roten) Elektrode wurde am Processus xiphoideus durch zwei nicht resorbierbare Nähte fixiert (PERMA Handseide, 6-0) und lag so zwischen Leber und Diaphragma. Als Infektionsprophylaxe erfolgte die intraperitoneale Verabreichung eines Antibiotikums (30 mg/kg KGW Sulfadoxin und 6 mg/kg KGW Trimethoprim, Borgal® 24 %, Virbac, Carros, Frankreich) intra operationem. Danach wurde die Bauchdecke mittels fortlaufender Naht verschlossen (VICRYL, 6-0) und die darüber liegende Haut geklammert (3M Precise<sup>TM</sup>).

**Antagonisierung** Da ein langer Nachschlaf bei Nagetieren wegen der imminenten Gefahr der Unterkühlung unerwünscht ist, wurde unmittelbar nach abgeschlossener Operation die Anästhesie durch eine Kombination von Naloxon (1,2 mg/kg KGW, Narcani®, Inresa, Freiburg im Breisgau, Deutschland), Flumazenil (0,5 mg/kg KGW, Anexate®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und Atipamezol (2,5 mg/kg KGW, Antisedan®, Orion Pharma, Hamburg, Deutschland) antagonisiert.

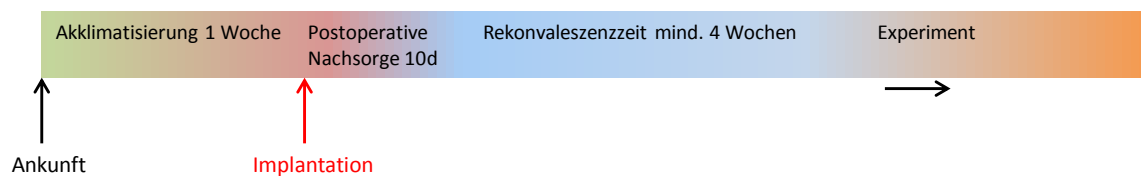
**Postoperative Phase** Unmittelbar nach der Operation erfolgte eine analgetische Behandlung mit Buprenorphin (0,08 mg/kg KGW, Buprenovet®, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Zum Aufwachen wurden die Tiere in einen auf einer Wärmeplatte stehenden Käfig verbracht und für ca. 3 Stunden unter Beobachtung dort gelassen. Danach kehrte die Maus in den Tierhaltungsraum zurück und wurde mit einer zweiten ebenfalls operierten Maus zusammen gehalten. Für die nächsten zwei Tage erfolgte zweimal täglich eine s.c. Injektion von Buprenorphin (0,08 mg/kg KGW) zur Analgesie postoperativer Schmerzen [Baumans et al., 2001]. Zur erleichterten Futteraufnahme wurden autoklavierte Haferflocken im Käfig angeboten. In der postoperativen Phase wurden für die Dauer von 10 Tagen täglich der allgemeine Gesundheitszustand ermittelt, die Futter und Wasseraufnahme sowie der Wundbereich kontrolliert und

die Tiere gewogen.

Zur objektiven Beurteilung wurden Abbruchkriterien wie folgt definiert:

- Gewichtsverlust von mehr als 20 % (Eigengewicht der Transmitter wird berücksichtigt)
- schlechter Allgemeinzustand an den Tagen 0-2 postoperativ (Seitenlage, ausgekühlte Körperoberfläche, kein spontane Aktivität nach manueller Stimulation)
- ab Tag 3 postoperativ: deutliche unphysiologische Körperhaltung mit verminderter Futter und Wasseraufnahme und verminderter Aktivität

Bei Zutreffen einer oder mehrerer dieser Kriterien wurde die betroffene Maus euthanasiert. Dies war jedoch bei keiner der operierten Mäuse notwendig. Vierzehn Tage nach der Operation wurden die Klammern entfernt und ab Tag 16 wurden die Mäuse mit ihren neuen nicht transmittierten Partnern lebenslänglich vergesellschaftet. Die Mäuse erhielten mindestens vier Wochen Rekonvaleszenzzeit nach der Transmitterimplantation bevor der erste Versuch startete (siehe Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3 :** Zeitliche Darstellung der Vorbereitung der Mäuse

**Sektion** Bei allen getöteten Tieren wurde eine Sektion durchgeführt, um pathologischen Auffälligkeiten erkennen zu können und die entsprechenden Tiere aus der Auswertung zu nehmen. Insbesondere die Befestigungsstellen der Elektroden wurden auf morphologische Veränderungen untersucht. Keines der operierten und für die Versuche eingesetzten Tiere war hierbei auffällig.

### Verarbeitung der Daten

Alle Daten wurden in sich frei bewegenden Tieren erhoben, ohne dass eine Anwesenheit im Raum oder Handling nötig waren. Die Datenausgabe erfolgte alle 10 Sekunden, was die höchste technische Auflösung der Telemetrieanlage darstellt. Dabei bilden die 10-Sekunden-Werte einen Mittelwert des Parameters über das Messintervall ab. Die aktuell erhobenen Werte wurden gleichzeitig auf dem Monitor des Computers als EKG und Körpertemperatur angezeigt und umgewandelt auf der Festplatte

gespeichert. Ein Teil der Datenanalyse basiert auf den 10 Sekunden Rohdaten. Für andere graphische Darstellungen wurden diese Rohdaten nochmal mittels der Analyse-Funktion „Moving Average“ in 5-Minuten-Intervalle bzw. 1-Stunden-Intervalle zusammengefasst. Alle Daten wurden als Mittelwerte aller Tiere über das jeweilige Zeitintervall dargestellt, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM, standard error of mean). Genauer findet sich unter Kapitel 3.4.

## 3.3 Versuchsplanung und Durchführung

Um Störungen und Interferenzen wie von Sorge et al. beschrieben zu vermeiden, waren bei allen Experimenten nur weibliche Personen anwesend [Sorge et al., 2014]. Alle Eingriffe fanden, in Anlehnung an die experimentelle Routine, in der Helligkeitsperiode statt. Zudem wurden alle routinemäßigen Arbeitsabläufe im Versuchsraum 3 Tage vor Beginn des Experiments beendet. Alle Eingriffe im Rahmen der Blutentnahme und Kennzeichnung wurden immer von derselben, geübten Person durchgeführt.

### 3.3.1 Methoden der Blutentnahme

Die Blutentnahmen fanden in Anlehnung an die Empfehlungen der GV-SOLAS statt [GV-SOLAS, 2009]. Alle Blutentnahmen wurden stets am selben Wochentag zwischen 9:00 und 10:00 Uhr durch dieselbe Person ausgeführt. Da durch die verschiedenen Methoden unterschiedlich viel Blut gewonnen werden kann, wurde unmittelbar nach Beginn des Blutaustritts die Blutentnahme gestoppt. Ziel war es, keine Beeinträchtigung der Tiere durch Hypovolämie zu erhalten. Um eine optimale Signalstärke des Transmitters zu gewährleisten, erfolgten alle Blutentnahmen direkt über dem Receiver.

#### Mäuse

Es wurden 16 operierte B6 Weibchen mit einem Alter von 14 Wochen eingesetzt und 10 operierte BALB/c Weibchen mit einem Alter von 16 Wochen.

#### Blutentnahme aus der Vena facialis

Die Fixierung erfolgte mittels Nackengriff, wodurch gleichzeitig eine Stauung der V. facialis erfolgte (Abbildung 3.4). Punktiert wurde die V. facialis an der rechten Kopfseite mittels Lanzette (siehe Tabelle 3.4), der Einstich erfolgte 3-4 mm kaudodorsal des Haarwirbels, senkrecht zum Unterkiefer in voller Länge der Lanzette. Ein Lösen der Stauung führte gleichzeitig zum Sistieren des Blutflusses. Nach Beendigung der Blutentnahme erfolgte direkt ein Zurücksetzen der Tiere in den Käfig.





**Abbildung 3.4 :** Fixierung zur Blutentnahme aus der Vena facialis

### **Blutentnahme aus der Schwanzvene**

Hierzu wurde die Maus im Restrainter (siehe Abbildung 3.5) fixiert und auf mittlerer Höhe des Schwanzes wurde in die rechte laterale Vena caudalis eine 23 G Kanüle flach eingeführt. Durch Fingerdruck am Schwanzansatz wurde die Vene leicht gestaut. Nach Beendigung der Blutentnahme erfolgte direkt ein Zurücksetzen in den Käfig. Es wurde bewusst auf ein Erweitern der Schwanzvene durch Erwärmen verzichtet. Die Belastung durch die hierzu notwendige zusätzliche Fixierung und insbesondere der Einfluss der Erwärmung auf den Stoffwechsel stehen einer Beurteilung der Stressbelastung durch die Blutentnahme selbst im Wege.



**Abbildung 3.5 :** Fixierung zur Blutentnahme aus der Schwanzvene

### **Blutentnahme aus der Vena saphena**

Für diese Methode wurde die Maus wie in Abbildung 3.6 zu sehen in einem Falcon Tube fixiert, wobei das rechte Bein nach oben ausgerichtet wurde und mit einer

23 G Kanüle punktiert wurde. Damit die Vene gut sichtbar ist, musste die entsprechende Stelle rasiert werden. Dies geschah bereits zwei Tage vor der Blutentnahme, um zusätzlichen Stress am Tag des Eingriffs zu vermeiden. Nach Beendigung der Blutentnahme erfolgte direkt ein Zurücksetzen in den Käfig.



**Abbildung 3.6 :** Fixierung zur Blutentnahme aus der Vena saphena (zur besseren Luftversorgung der Tiere wurde die Spitze des Tubes am konischen Ende entfernt)

### Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus

Die Blutentnahme erfolgte unter einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran. Mittels Fixierung im Nackengriff wurde die Maus zur Einleitung der Narkose vor die Atemmaske gehalten. Die Isoflurankonzentration betrug zur Einleitung 4 % in 5 l/min Sauerstoff. Bei Erreichen des Toleranzstadiums wurde die Isoflurankonzentration auf 2,5 % reduziert und mittels Hämatokritröhrchen erfolgte die Punktion des retrobulbären Venenplexus am rechten Auge (Abbildung 3.7). Hierfür wurde die Kapillare im medialen Augenwinkel eingeführt und unter rotierenden Bewegungen entlang des Augapfels vorgeschoben. Stößt die Kapillare auf die knöcherne Begrenzung der Orbita, muss sie für einige Millimeter zurück gezogen werden. Mittels Kapillarkraft strömt das Blut aus den verletzten Venengefäßen in die Kapillare. Nach Beendigung der Blutentnahme wurde die Narkosegaszufuhr gestoppt und die Maus direkt in den Käfig zurück gesetzt. Auch die entsprechende Kontrollmaus erhielt eine Isoflurannarkose von gleicher Dauer ohne jedoch den Venenplexus zu punktieren. Alle Blutentnahmen wurden am rechten Auge durchgeführt.

Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien.

### Einteilung der Gruppen

**C57BL6/J** Die mit Transmittern versehenen Tiere wurden zur Reduktion der Tierzahlen mehrfach für Messungen eingesetzt. Tabelle 3.5 zeigt das Schema, nachdem



**Abbildung 3.7 :** Lagerung der narkotisierten Maus zur retrobulbären Blutentnahme

**Tabelle 3.4 :** Verwendete Materialien zur Blutentnahme

Material	Herkunft
Einmalkanülen	Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Hämatokritröhrchen	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Isofluranverdampfer	Isoflurane Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland
Blutlanzetten	Solofix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

die Tiere in Kontroll- und Versuchsgruppe eingeteilt wurden. Beide Gruppen wurden in gleicher Weise und über gleichlange Zeit fixiert, aber nur bei den Tieren der Versuchsgruppe erfolgte eine Punktion mit nachfolgender Blutentnahme. Zwischen zwei Messungen wurde jeweils eine Erholungsphase von einer Woche eingeschoben. Durch die rotierende Versuchsanordnung kam es maximal zu drei Blutentnahmen pro Maus, die jeweils mit einer anderen Methode erfolgten. Zwischen zwei Blutentnahmen herrschte somit ein Abstand von zwei Wochen.

Daraus ergibt sich eine Anzahl von  $n=10$  Messungen für die vier verschiedenen Formen der Blutentnahme und die entsprechenden Kontrollen.

**BALB/cJRj** Um stammspezifische Unterschiede zu erfassen, wurden die Blutentnahmen aus der Schwanzvene und der Vena facialis zusätzlich in BALB/c Mäusen durchgeführt. Wie bei den B6 Mäusen erfolgte die Einteilung in Kontroll- und Versuchsgruppe nach einem festgelegten Muster (siehe Tabelle 3.5). Durch diese Versuchsanordnung kam es zu maximal zwei Blutentnahmen bzw. Kontrollfixierungen pro Maus, wobei auch hier jeweils mindestens zwei Wochen Pause zwischen zwei Blutentnahmen eingehalten wurde.

So ergeben sich ebenfalls  $n=10$  Messungen für die beiden Formen der Blutentnahme und die entsprechenden beiden Kontrollen.

**Tabelle 3.5 :** Versuchsplan der B6 und der BALB/c Mäuse für die Untersuchungen zur Blutentnahme; die 16 B6 Mäuse wurden von 1-16 und die 10 BALB/c Mäuse von 1-10 durchnummeriert

<b>C57BL6/J</b>									
	Schwanzvene Blutentnahme	Schwanzvene Kontrolle	V. facialis Blutentnahme	V. facialis Kontrolle	V. saphena Blutentnahme	V. saphena Kontrolle	retrobulbäre Blutentnahme	retrobulbäre Kontrolle	
1. Termin	1	2	3	4	5	6	7	8	
2. Termin	8	1	2	3	4	5	6	7	
3. Termin	7	8	1	2	3	4	5	6	
4. Termin	6	7	8	1	2	3	4	5	
5. Termin	5	6	7	8	1	2	3	4	
1. Termin	9	10	11	12	13	14	15	16	
2. Termin	16	9	10	11	12	13	14	15	
3. Termin	15	16	9	10	11	12	13	14	
4. Termin	14	15	16	9	10	11	12	13	
5. Termin	13	14	15	16	9	10	11	12	
<b>BALB/cJRj</b>									
	Schwanzvene Blutentnahme	Schwanzvene Kontrolle	V. facialis Blutentnahme	V. facialis Kontrolle	Schwanzvene Blutentnahme	Schwanzvene Kontrolle	V. facialis Blutentnahme	V. facialis Kontrolle	
1. Termin	1	2	3	4	5	6	7	8	
2. Termin	10	1	2	3	4	5	6	7	
3. Termin	9	10	1	2	3	4	5	6	
4. Termin	8	9	10	1	2	3	4	5	
1. Termin	-	-	9	10	-	-	-	-	
2. Termin	-	-	8	9	-	-	-	-	
3. Termin	7	8	-	-	-	-	-	-	
4. Termin	6	7	-	-	-	-	-	-	

## Analyse der Daten

Die graphische Darstellung und Analyse erfolgte in drei Zeitintervallen.

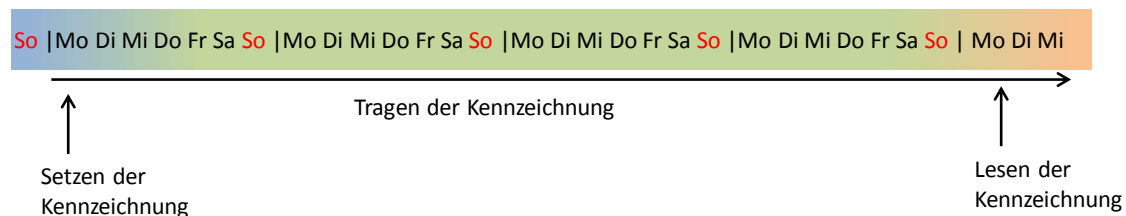
**Akute Phase der Manipulation** Die *Akute Phase* umfasst die Abbildung der Rohdaten von fünf Minuten vor bis fünf Minuten nach dem Eingriff. Die dargestellten Werte wurden im 10 sec Abstand erhoben und stellen die höchste Auflösung der Telemetrieanlage dar.

**Arousal Phase der Manipulation** Für die *Arousal Phase* wurden die 10 sec Werte über Intervalle von fünf Minuten gemittelt und dieser Mittelwert pro Maus ausgegeben. Die Arousal Phase zeigt diese über 5 min Intervalle gemittelten Werte für den Zeitraum von 60 Minuten vor bis 60 Minuten nach dem Eingriff.

**Tag/Nacht-Rhythmus um den Zeitpunkt der Manipulation** Um mögliche Einflüsse der Manipulationen auf den Tag/Nacht-Rhythmus von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zu erfassen, wurden die 10 sec Werte über eine Stunde gemittelt und dargestellt. Die Zusammenfassung auf eine Stunde erlaubt eine ausreichend geglättete Darstellung, hebt aber immer noch wichtige Merkmale wie die Arousal Reaktion hervor. Die graphische Darstellung der Tag/Nacht-Rhythmik beinhaltet den Tag vor der Blutentnahme (= Tag -1), den Tag des Eingriffes (= Tag 0) und die zwei nachfolgenden Tage (= Tag +1 und Tag +2).

### 3.3.2 Methoden der Kennzeichnung

Das Setzen sowie das Lesen der Kennzeichnung erfolgte stets montags zwischen 9 und 10 Uhr durch dieselbe, geübte Person. Um einen Langzeiteffekt der Kennzeichnung auf Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zu erfassen, wurden die Parameter der gekennzeichneten Tiere ebenso wie die der Kontrollen über 28 Tage telemetrisch gemessen.



**Abbildung 3.8 :** Zeitliche Darstellung zum Versuchsverlauf für eine einzelne Maus bei den verschiedenen Formen der Kennzeichnung

## Mäuse

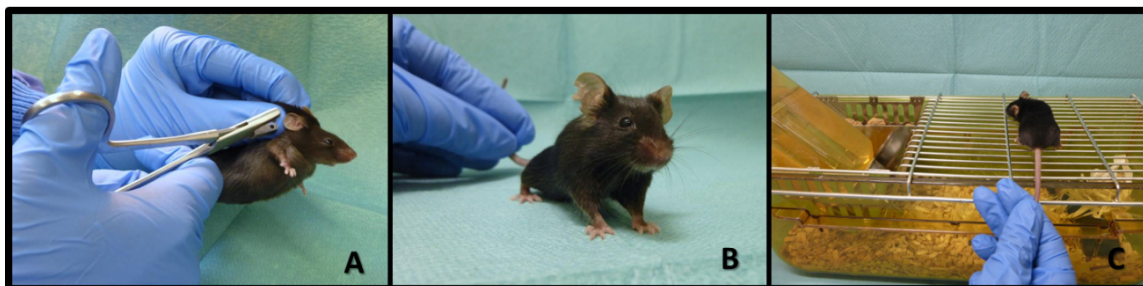
Zur Belastungsbeurteilung durch verschiedene Formen der Kennzeichnung wurden 48 transmitterimplantierte C57BL/6J Weibchen im Alter von 15-22 Wochen eingesetzt.

### Kennzeichnung mittels Ohrlochung

Die standardmäßig eingesetzte und auch im vorliegenden Fall verwendete Ohrlochzange stanzt Ohrlöcher mit 2 mm Durchmesser aus. Die Schmerzhaftigkeit des Eingriffes hängt vermutlich zu einem großen Teil von der Qualität der Zange ab, wobei stumpfe Ohrlochzangen den Schmerz erhöhen könnten. Um Variationen in diesem Punkt auszuschließen wurde für diese Experimente eine Ohrlochzange neu bezogen und ausschließlich hierfür eingesetzt.

**Setzen** Zur Kennzeichnung mittels Ohrlochung wurden die Tiere im Nackengriff fixiert und das rechte Ohr mit zwei randständigen Ohrlöchern markiert, wobei ca.  $\frac{3}{4}$  der Stanzfläche innerhalb und ca.  $\frac{1}{4}$  außerhalb der Pinna lokalisiert waren (Abbildung 3.9). Dies entspricht der durchschnittlichen Ohrlochanzahl eines komplexen Markierungsschematas.

**Lesen** Zum Lesen wurden die Tiere am Schwanzansatz hochgehoben und auf dem Käfigdeckel abgesetzt.



**Abbildung 3.9** : A: Setzen des Ohrlochs, B: zweifache Ohrlochung am rechten Ohr, C: Fixierung zum Ablesen der Ohrlochung

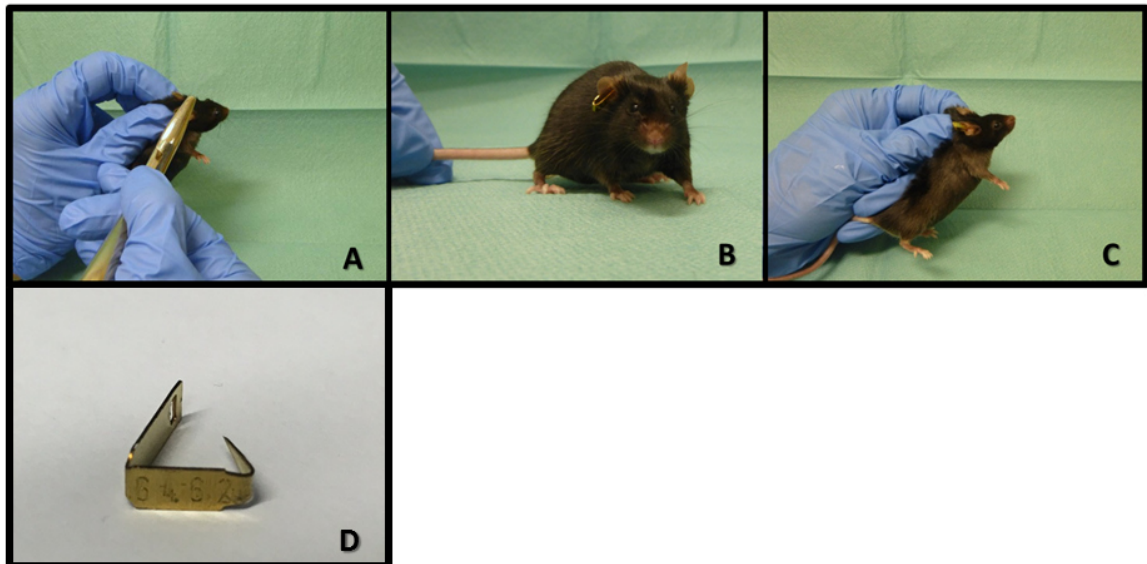
### Kennzeichnung mittels Ohrmarke

Die verwendeten Ohrmarken bestanden aus Messing und besaßen eine Größe von 9 x 3 mm und eine Gewicht von 0,17 g.

**Setzen** Die Tiere wurden im Nackengriff fixiert und die Ohrmarke am rechten Ohr tief in die Ohrmuschel gesetzt. Der korrekte Sitz der Ohrmarke ist hierbei von großer Wichtigkeit (Abbildung 3.10).



**Lesen** Zum genauen Lesen der Ohrmarkennummer wurden die Tiere ebenfalls im Nackengriff fixiert.



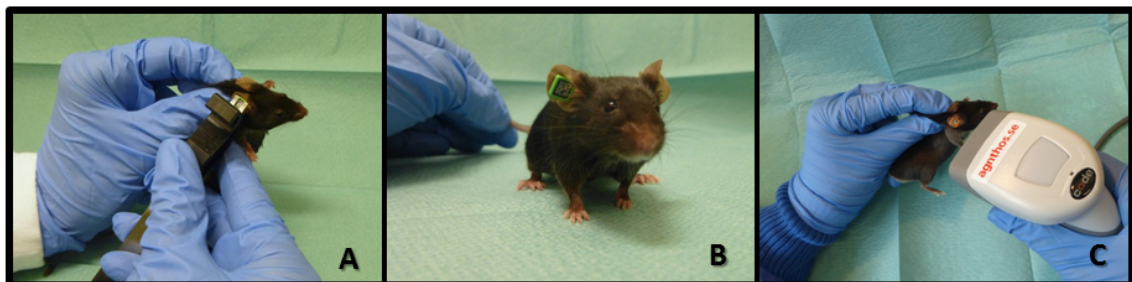
**Abbildung 3.10** : A: Setzen der Ohrmarke, B: Tragen der Ohrmarke, C: Fixierung zum Ablesen der Ohrmarke, D: Ohrmarke

### Kennzeichnung mittels RapID

Die RapID Ohrmarken sind aus biologisch inertem Plastik mit einem 2D-Barcode auf der Vorderseite. Sie besitzen eine Größe von 5 x 5 mm und wiegen weniger als 0,07 g.

**Setzen** Zum Setzen der RapID Ohrmarke wurden die Tiere ebenfalls im Nackengriff fixiert und die Ohrmarke ins rechte Ohr gesetzt (Abbildung 3.11).

**Lesen** Zum Lesen des Barcodes mit dem dazugehörigen Scanner wird die Maus im Nackengriff fixiert und das rechte Ohr gescannt.



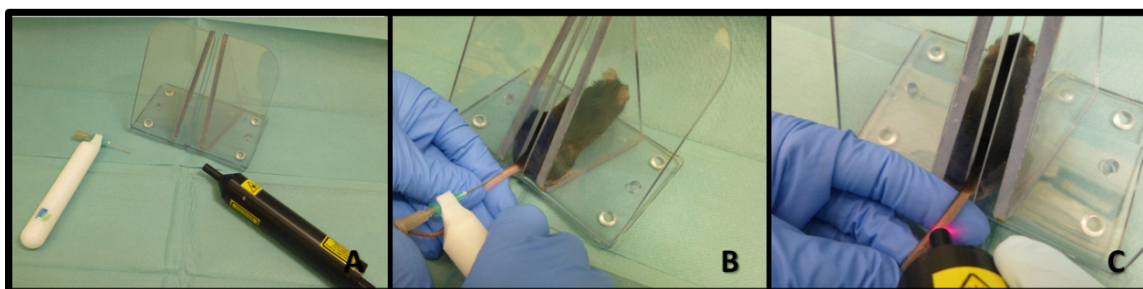
**Abbildung 3.11** : A: Setzen der RapID Ohrmarke, B: Tragen der RapID, C: Fixierung zum Ablesen der RapID mittels Scanner

### Kennzeichnung mittels p-Chip

Der p-Chip besitzt eine Größe von 600 x 600 x 100 µm, ein Gewicht von 85 µg und einen integrierten Schaltkreis mit Seriennummer. Er befindet sich in einer 21 G Kanüle die steril verpackt geliefert wird. Ein innen liegender Stab (27 G) schiebt den Chip vor und platziert ihn unter der Haut.

**Setzen** Die Fixierung erfolgte in einer speziell vom Hersteller für den p-Chip entwickelten Fixierwand (Abbildung 3.12). Der p-Chip wurde in einer Kanüle liegend geliefert und mittels wiederverwendbarem Injektor subkutan an der rechten Seite des Schwanzes ungefähr 2 cm distal der Basis parallel zur Körperoberfläche injiziert.

**Lesen** Hierzu wurde die Maus ebenfalls in der Fixierwand fixiert und der Chip mittels speziellem Laser gelesen.



**Abbildung 3.12 :** A: zugehörige Materialien v.l.n.r. Injektionshilfe mit Kanüle und p-Chip, Fixierwand, Laser-Lesegerät, B: Setzen des p-Chip, C: Fixierung zum Ablesen des p-Chip mittels Laser

Tabelle (3.6) gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien.

**Tabelle 3.6 :** Verwendete Materialien zur Kennzeichnung

Material	Herkunft
Ohrlochzange	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ohrmarken aus Messing, Ohrmarkenzange	Hauptner und Herberholz GmbH & Co. KG, Solingen, Deutschland
RapID Ohrmarke, Ohrmarkenzange, Leser	AgnTho's AB, Lidingö, Schweden
p-Chip, Leser	UNO Roestvaststaal BV, Zevenaar, Niederlande



## Einteilung der Gruppen

Zur Kennzeichnung mittels Ohrloch, Ohrmarke und RapID war die gleiche Form des Handlings und der Fixierung notwendig: der Nackengriff. Aus diesem Grund genügte es, eine einzige Kontrollgruppe zum Setzen, Tragen und Lesen dieser drei Kennzeichnungsformen einzurichten. Diese Kontrollgruppe wurde beim Setzen ebenfalls im Nackengriff fixiert, beim Lesen der Kennzeichnung wurde hingegen nur der Käfigdeckel für 3 sec geöffnet, die Maus aber nicht berührt. Damit sich eventuelle Störungen auf alle Gruppen gleich auswirken, wurden stets parallel Tiere aus allen Gruppen telemetrisch gemessen, also Kontrolle, Ohrloch, Ohrmarke, RapID. Da sich die Fixierung für den p-Chip von der Fixierung für die Ohrkennzeichnung unterscheidet, war es notwendig, hierzu auch eine eigene entsprechend fixierte Kontrolle mitzuführen. Anders als im Versuch Blutentnahme erlaubte die limitierte Batterieleistung des Transmitters keine Wiederverwendung der Tiere. Für die vier Formen der Kennzeichnung und die zwei unterschiedlichen Kontrollen liegt eine Messhäufigkeit von  $n=8$  vor.

## Analyse der Daten

Die Analyse erfolgte identisch zum Versuch Blutentnahme in drei Messphasen. Getrennt für das Setzen und das Ablesen der Kennzeichnung wurde die *Akute Phase* und die *Arousal Phase* des Eingriffs sowie der *Tag/Nacht-Rhythmus* um den Zeitpunkt der Manipulation dargestellt. In ausgesuchten Fällen wurde die Arousal Phase auch auf die 2. Stunde nach dem Eingriff erweitert. Um einen möglichen Langzeiteffekt des Tragens zu erkennen, wurde eine weitere Darstellung (*Tag/Nacht-Rhythmus des Tragens*) erarbeitet.

**Tag/Nacht-Rhythmus des Tragens der Kennzeichnung** Für das vierwöchige Tragen der Kennzeichnung wurden einmal pro Woche zwei aufeinanderfolgende Tage ausgewählt (Tag 5 und Tag 6, Tag 12 und Tag 13, Tag 19 und Tag 20 sowie Tag 26 und Tag 27) und als Abbildung dargestellt. Dies entspricht immer den Wochenendtagen Samstag und Sonntag, da hier mit den geringsten Störungen der Tiere zu rechnen ist. Wie in der Darstellung des *Tag/Nacht-Rhythmus* um den Zeitpunkt des Eingriffs auch, werden die 10 sec Werte hierbei über eine Stunde gemittelt.

## 3.3.3 Chronisches Stressmodell

### Mäuse

Es wurden 16 transmitterimplantierte  $Apoe^{-/-}$  Mäuse im Alter von 16 Wochen verwendet.

## Aufbau des Versuchs und Einteilung der Gruppen

Die sechzehn Tiere wurden randomisiert in eine Gruppe mit Stress und eine Gruppe ohne Stress aufgeteilt, mit jeweils acht Mäusen pro Versuchsgruppe. Als Stressoren wurden häufiger Käfigwechsel (bis zu drei mal pro Tag) und wechselnde Phasen aus Einzel- und Partnerhaltung eingesetzt. Um mit jedem Käfigwechsel einen maximal großen Stimulus zu erreichen, wurde ein Abstand von mindestens 3 h zwischen zwei Käfigwechseln eingehalten. Voruntersuchungen zeigten, dass eine Zeitspanne von 3 Stunden erforderlich ist, damit sich die durch den Käfigwechsel erhöhten Parameter wieder normalisieren. Nach Einzelhaltung wurden die Mäuse stets wieder mit dem gleichen Partner zusammen gesetzt. Die komplette Versuchsdauer (und damit auch das Stressregime) betrug 20 Wochen. Limitiert durch die Batterieleistung des Transmitters konnten nur Versuchswoche 1, 5, 9, 13 und 17 telemetrisch gemessen werden. Beide Gruppen erhielten vier Wochen nach Versuchsbeginn eine atherogene Western Diät (Kliba® Nr. 2480, Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz) wodurch die Entwicklung atherosklerotischer Aortenläsionen bei  $\text{Apoe}^{-/-}$  Mäusen deutlich beschleunigt wird. Die Mäuse der ungestressten Gruppe saßen permanent zu zweit und wurden, bis auf einen kompletten Einstreu- und Flaschenwechsel am Montag, nicht gestört. Bei der Stress Gruppe wurde ein sozialer Stress ausgelöst, indem nach einem festgelegten Muster (siehe Tabelle 3.8) das Partnertier aus dem Käfig entnommen wurde und/oder ein mehrfacher Käfigwechsel stattfand. Um keine Gewöhnung zu erreichen, wurde die Abfolge dieser Stressoren wöchentlich variiert (siehe Tabelle 3.8). Im Rahmen des routinemäßigen Käfigwechsels am Montag wurden die Mäuse beider Gruppen gewogen (HT-500, A&D Instruments Ltd, Abington, England).

**Tabelle 3.7 :** Inhaltsstoffe Kliba Nr. 2480, Experimentalfuttermittel *Western Diet*

Rohprotein 18,0 %	Kalzium 6,5 g/kg	Mangan 12,0 mg/kg	Vitamin A 4000 IE/kg
Rohfaser 3,8 %	Phosphor 4,5 g/kg	Zink 45,0 mg/kg	Vitamin D3 1000 IE/kg
Rohfett 21,0 %	Natrium 2,0 g/kg	Selen 0,22 mg/kg	
Rohasche 4,0 %	Kupfer 6,0 mg/kg		

Für andere, in dieser Arbeit nicht thematisierte Fragestellungen wurde den Tieren beider Gruppen in Versuchswoche 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 vor Beginn der Helligkeitsphase Blut aus der V. facialis (alternierend an beiden Seiten) entnommen. In Versuchswoche 14 ist eine Maus aus der ungestressten Gruppe während der Blutentnahme gestorben.

## Analyse der Daten

Für diesen Versuch wurden zwei Abbildungsformen erarbeitet.

**Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus** In Anlehnung an die Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus bei Blutentnahme oder Kennzeichnung wur-

**Tabelle 3.8 :** Verteilung der Stressoren zur chronischen Stressbelastung in der Versuchsgruppe

Versuchswoche	Wochentag	Stressregime
1, 5, 9, 13, 17	Montag	Partnerhaltung; zweimal Käfigwechsel; Flaschenwechsel
	Dienstag	Einzelhaltung; dreimal Käfigwechsel
	Mittwoch	Einzelhaltung; einmal Käfigwechsel
	Donnerstag	Einzelhaltung
	Freitag	Partnerhaltung; zweimal Käfigwechsel
	Samstag	Partnerhaltung
	Sonntag	Partnerhaltung
2, 6, 10, 14, 18	Montag	Einzelhaltung; dreimal Käfigwechsel; Flaschenwechsel
	Dienstag	Einzelhaltung; einmal Käfigwechsel
	Mittwoch	Einzelhaltung
	Donnerstag	Partnerhaltung; dreimal Käfigwechsel
	Freitag	Einzelhaltung; zweimal Käfigwechsel
	Samstag	Partnerhaltung
	Sonntag	Partnerhaltung
3, 7, 11, 15, 19	Montag	Partnerhaltung; einmal Käfigwechsel; Flaschenwechsel
	Dienstag	Partnerhaltung; zweimal Käfigwechsel
	Mittwoch	Partnerhaltung; dreimal Käfigwechsel
	Donnerstag	Einzelhaltung
	Freitag	Einzelhaltung; zweimal Käfigwechsel
	Samstag	Partnerhaltung
	Sonntag	Partnerhaltung
4, 8, 12, 16, 20	Montag	Einzelhaltung; einmal Käfigwechsel; Flaschenwechsel
	Dienstag	Einzelhaltung
	Mittwoch	Einzelhaltung; dreimal Käfigwechsel
	Donnerstag	Partnerhaltung; zweimal Käfigwechsel
	Freitag	Partnerhaltung; einmal Käfigwechsel
	Samstag	Partnerhaltung
	Sonntag	Partnerhaltung

den hier ebenfalls alle 10 sec Werte auf eine Stunde zusammengefasst und über die kompletten 7 Tage abgebildet.

**Übersichtsdarstellung des Tag/Nacht-Rhythmus** Um einen Überblick über alle Messwochen zu erhalten, wurden darüber hinaus alle Daten der Helligkeitsperiode sowie alle Daten der Dunkelperiode von einer gesamten telemetrisch erfassten Woche zusammen gefasst. Diese Übersichtsdarstellung reduziert alle innerhalb einer zusammenhängenden Woche erhobenen telemetrischen Rohdaten auf jeweils einen Wert für die Helligkeits- und einen Wert für die Dunkelperiode. Diese grobe Darstellung lässt keine Analyse der Tagestendenzen zu, hierfür muss auf die wochenweise Darstellung ausgewichen werden. Die Übersicht ist aber sehr gut geeignet, um Er-

gebnistrends zwischen den einzelnen gemessenen Wochen darzustellen.

## 3.4 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

### 3.4.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot Version 13.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Alle dargestellten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aller Mäuse einer Gruppe in diesem Zeitintervall. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM, Standard error of mean). Für die Abbildung der Ergebnisse wurden verschiedene Auflösungen der Zeitachse gewählt wobei sowohl für die verschiedenen Formen der Blutentnahme als auch der Kennzeichnung drei Darstellungsmodi erarbeitet wurden. Die blaue (gegebenenfalls auch rote) vertikale Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt der Punktion bzw. des Setzens oder Lesens der Kennzeichnung. Bei den Kontrollen stellt sie den Zeitpunkt dar, an dem der Eingriff üblicherweise vorgenommen worden wäre. In Abbildungen zur Langzeitbelastung sind statt Zeitangaben graue und weiße Balken auf der X-Achse zu sehen. Der graue Balken entspricht der Dunkelperiode (19-7 Uhr), der weiße Balken der Helligkeitsperiode (7-19 Uhr). Alle Grafiken beinhalten eine ausreichend lange Zeitspanne vor dem Eingriff, die als longitudinale Kontrolle zu verstehen ist. Die Skalierung der Y-Achse wurde für Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität wann immer sinnvoll über die verschiedenen Zeitfenster beibehalten. Nachfolgende Tabellen (3.9, 3.10 und 3.11) zeigen eine Übersicht über die entsprechenden Darstellungen in den einzelnen Teilversuchen.

**Tabelle 3.9 :** Darstellungsmodi des Versuchs Blutentnahme

Bezeichnung	Zeitspanne	Datenpunkte
Akute Phase	-5 min bis +5 min	alle 10 sec
Arousal Phase	-1 h bis +1 h	gemittelt über 5 min
Tag/Nacht-Rhythmus	-1 Tag bis + 2 Tage	gemittelt über 1 h

### 3.4.2 Statistische Auswertung

Die biometrische Planung und die statistische Analyse wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biostatistik des DKFZ durchgeführt. Für alle Daten wurde als statistischer Test eine Varianzanalyse mit Messwiederholung (Repeated measures analysis of variance; RM ANOVA) mittels SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North

**Tabelle 3.10 :** Darstellungsmodi des Versuchs Kennzeichnung

Bezeichnung	Zeitspanne	Datenpunkte
Akute Phase des Setzens bzw. Lesens	-5 min bis +5 min	alle 10 sec
Arousal Phase des Setzens bzw. Lesens	-1 h bis +1 h	gemittelt über 5 min
Tag/Nacht-Rhythmus um den Tag des Setzen bzw. Lesen	-1 Tag bis + 2 Tage	gemittelt über 1 h
Tag/Nacht-Rhythmus des Tragens	viermal 2 aufeinander- folgende Tage	gemittelt über 1 h

**Tabelle 3.11 :** Darstellungsmodi des Versuchs chronischer Stress

Bezeichnung	dargestellte Zeitspanne	Datenpunkte
Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus	7 aufeinanderfolgende Messtage	Mittelung der 10 sec Rohwerte über 1 h
Übersichtsdarstellung des Tag/Nacht-Rhythmus	alle Versuchswochen (Daten von einer Woche zu jeweils 2 Werten zusammengefasst)	Mittelung aller Daten der Helligkeits- bzw. Dunkelperiode von einer Messwoche

Carolina, USA) durchgeführt und ein Signifikanzlevel von 5% festgelegt. Berücksichtigt werden hierbei die Variablen Stress und Zeit. Die Korrektur ungleicher Varianzen erfolgte nach Greenhouse-Geisser. Die Daten wurden in mehrere Auswertungsphasen eingeteilt und die RM ANOVA jeweils pro Phase bestimmt.

**Formen der Blutentnahme** Eine Varianzanalyse wurde einmal jeweils für die *Akute Phase* und *Arousal Phase* sowie für den *Tag/Nacht-Rhythmus* sowohl für die Zeitspanne vor der Blutentnahme als auch für die Zeitspanne nach der Blutentnahme durchgeführt. Dabei sind Signifikanzen vor der Blutentnahme nur insofern interessant, als sie auf eine ungleiche Erregung von Versuchs- und Kontrolltieren schon vor Beginn der eigentlichen Versuchsphase hinweisen. Von eigentlicher Bedeutung sind nur signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe nach der Blutentnahme. Statistische Signifikanzen in beiden Zeitspannen sind schwierig zu interpretieren. Bei der Darstellung der Daten über vier Tage wurde die Varianzanalyse nur am Tag vor der Blutentnahme (Tag -1) und am Tag der Blutentnahme (Tag 0) durchgeführt. Wurden statistisch signifikante Unterschiede an Tag 0 erkannt, wurden auch noch Tag 1 und Tag 2 nach der Blutentnahme in die Auswertung mit einbezogen.

**Formen der Kennzeichnung** Ebenso wie bei der Blutentnahme wurde auch hier die Varianzanalyse für unterschiedliche Zeitspannen durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine Varianzanalyse jeweils für die zwei zusammenhängenden Tage beim Tragen der Kennzeichnung durchgeführt.

**Langzeitbelastung** Statistische Untersuchungen wurden nur für die Übersichtsdarstellung des Tag/Nacht-Rhythmus und den Gewichtsverlauf angewendet. Hier interessieren Unterschiede zwischen den gestressten und den ungestressten Tieren, sowie der Verlauf der Kurven über die Zeit.

**Darstellung in den Abbildungen** Zusätzlich zur tabellarischen Form (Tabelle 4.1, 4.2 und 4.3) sind die statistischen Ergebnisse auch in den jeweiligen Abbildungen eingetragen. Hierbei steht n.s. für nicht signifikant und \* für signifikant mit entsprechender Versuchsgruppe in Klammern. In der Tabelle zeigt  $s^1$  einen statistischen Effekt zwischen beiden Gruppen an und  $s^2$  eine Interaktion, also einen zeitabhängigen Unterschied zwischen beiden Gruppen.

## 4 Ergebnisse

## 4.1 Verschiedene Methoden der Blutentnahme

Eine einmalige Blutentnahme kann über zwei unterschiedliche Mechanismen zu einer Belastung der Tiere führen. Neben akutem Wundschmerz, der durch Penetration der Haut und Gewebeschädigung mit möglicher nachfolgender Entzündungsreaktion entsteht, lösen kurz dauernde Zwangsmaßnahmen wie das Fangen und Fixieren der Tiere eine Stressreaktion aus.

### 4.1.1 Blutentnahme aus der Vena saphena

#### C57BL/6

Die Herzfrequenz der Kontrollgruppe zeigt in der *Akuten Phase* einen charakteristischen Verlauf (Abbildung 4.1). Bereits vor Beginn der Blutentnahme kommt es zu einer sukzessiven Erregung der Maus mit einem kontinuierlichen Anstieg der Herzfrequenz, die durch Betreten des Raums, Öffnen des Käfigs und Einfangen des Tieres ausgelöst wird. Die bloße Fixierung führt zu extrem gesteigerten Herzfrequenzen für die dargestellten 5 Minuten. Hierbei werden im Einzelfall Herzfrequenzen von über 790 Schlägen pro Minute, im Durchschnitt von bis zu 750 Schlägen pro Minute erreicht. Die hohen Herzfrequenzen der Kontrolltieren bei der Manipulation halten über die weitere Beobachtungszeit an und sind durch einen sehr niedrigen Standardfehler geprägt. Dies bedeutet, dass alle Mäuse Werte in der gleichen Größenordnung aufweisen.

Die Werte der Körpertemperatur zeigen in der akuten Phase einen anderen Verlauf, der durch einen kontinuierlichen Anstieg der Temperatur über die gesamte Beobachtungszeit von 5 Minuten gekennzeichnet ist.

Eine deutliche Aktivitätssteigerung der Kontrolltiere ist kurz vor Zeitpunkt 0 zu sehen und spiegelt die erhöhte Bewegung der Tiere während des Einfangens wider (siehe Abbildung 4.1). Als Reaktion auf die Fixierung zeigt sich im Zeitfenster 0 bis +300 sec eine höhere Aktivität als vor der Manipulation.

Die Tiere der Blutentnahmegruppe weisen vor der Punktion keine signifikanten Unterschiede von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zu den Kontrollen auf. Die Herzfrequenz der an der Vena saphena punktierten Tiere ist nach dem Eingriff signifikant niedriger als die der lediglich fixierten Kontrollen. Bei Körpertemperatur und Aktivität gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der Zeitspanne nach dem Eingriff.

In der *Arousal Phase* zeigt die Herzfrequenz der Kontrollen einen charakteristischen Verlauf (Abbildung 4.2). Die schrittweise Erregung der Mäuse vor dem Eingriff wird auch in diesem Zeitfenster deutlich. Das Maximum der Herzfrequenz wird mit durchschnittlich bis zu 720 Herzschlägen pro Minute in den ersten fünf Minuten



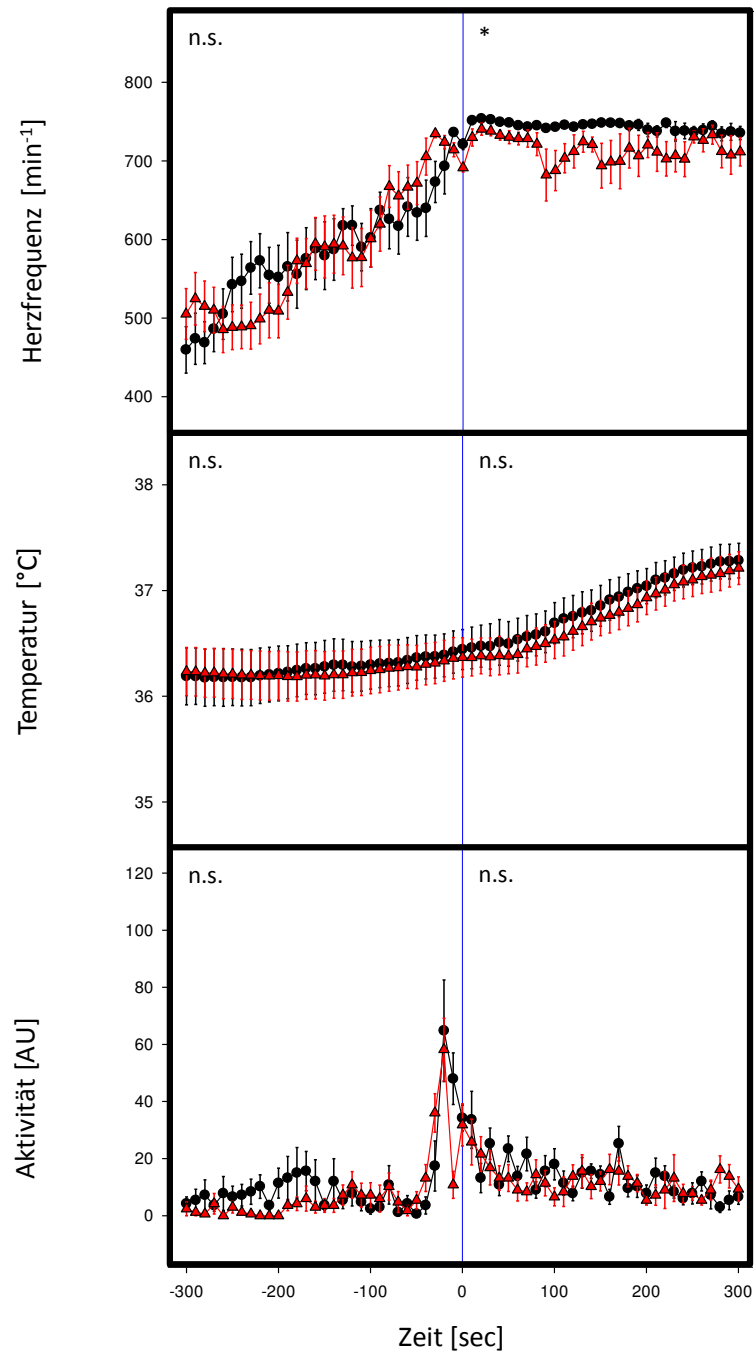
nach der Blutentnahme erreicht. Dies spiegelt den in der akuten Phase beobachteten Plateauzustand wider. Der ausgewählte Beobachtungszeitraum bis eine Stunde nach Blutentnahme genügt, um eine Normalisierung der Herzfrequenz auf Ruhenniveau zu erreichen.

Auch die etwas verzögert reagierende Temperatur der Kontrolltiere zeigt einen glockenförmigen Verlauf, der innerhalb der dargestellten 60 Minuten wieder auf Ausgangswerte zurückkehrt.

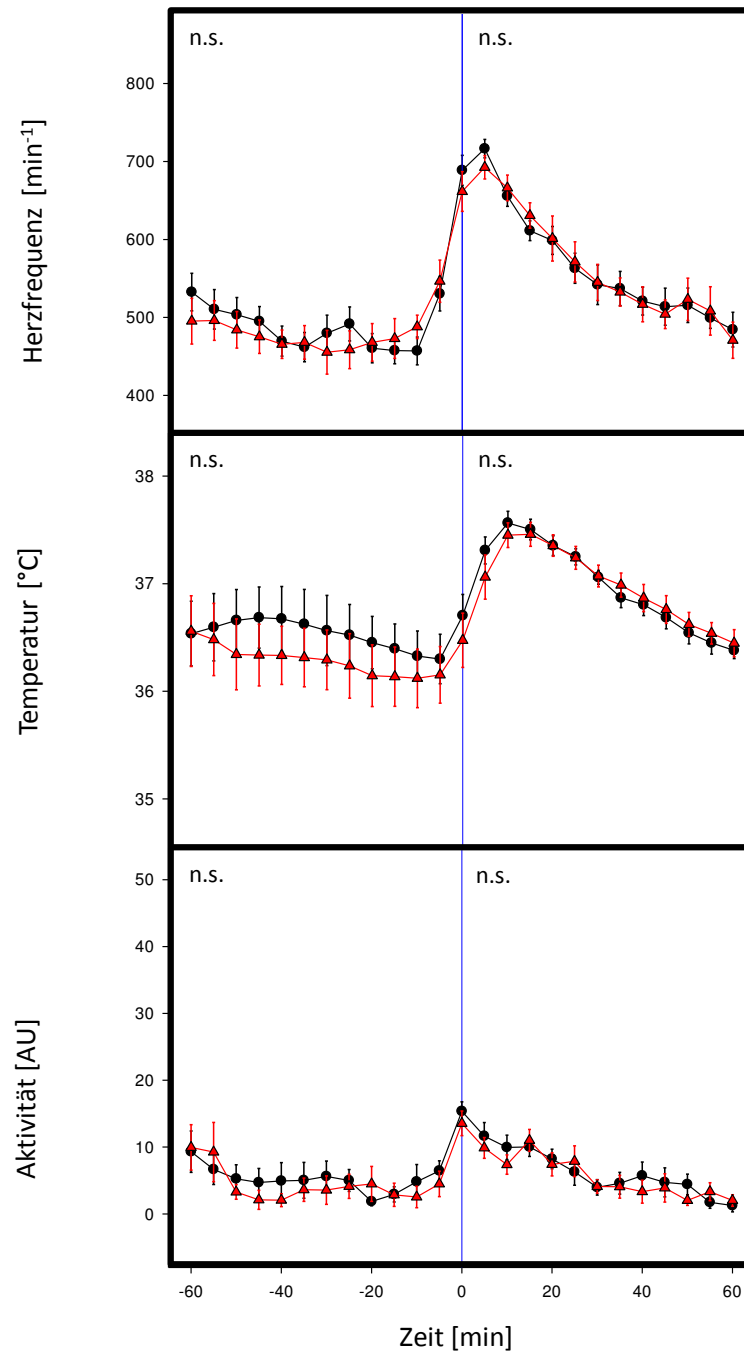
Eine gesteigerte Aktivität der Kontrollen ist nur innerhalb der ersten 30 Minuten nach der Fixierung zu verzeichnen. Maximalwerte der Aktivität werden zum Zeitpunkt der Fixierung erreicht.

Der Kurvenverlauf der Versuchsgruppe unterscheidet sich weder für Herzfrequenz noch für Körpertemperatur oder Aktivität von dem der Kontrollgruppe. Es gibt weder vor dem Eingriff noch nach dem Eingriff statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

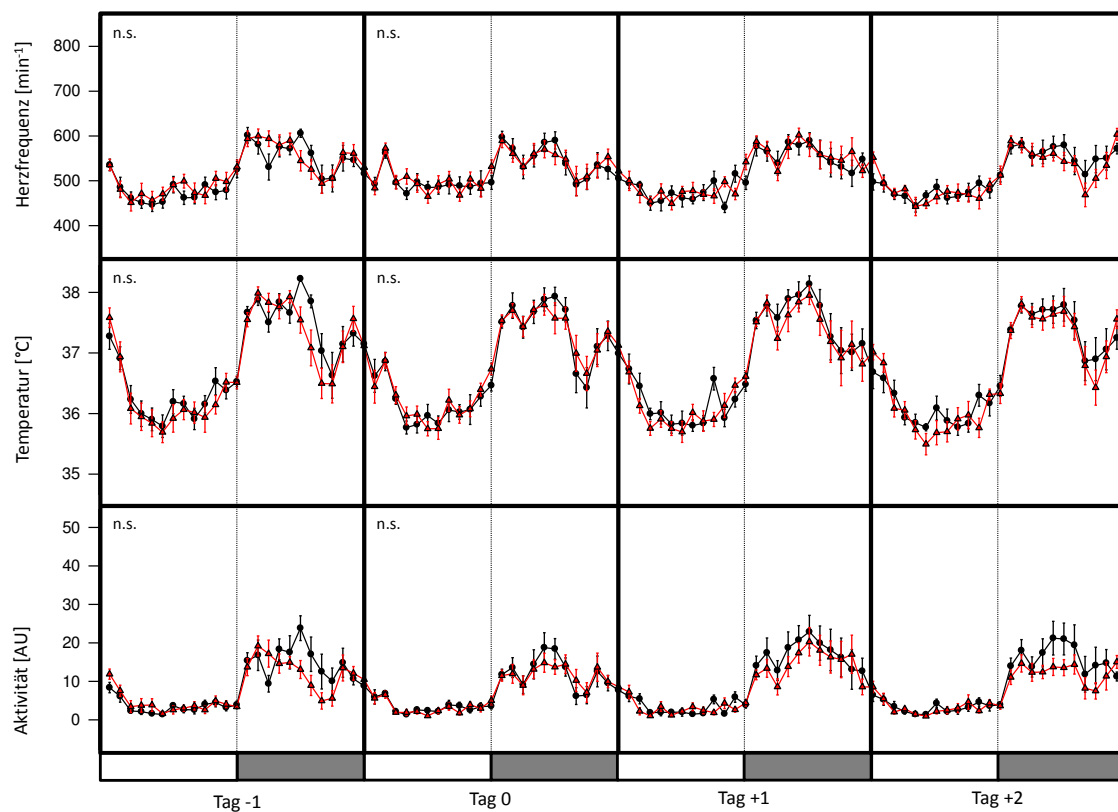
Um zu erkennen ob die Blutentnahme einen nachhaltigen Effekt auf den Verlauf der gemessenen Parameter hat, wurde der *Tag/Nacht-Rhythmus* von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität der Mäuse untersucht und abgebildet (Abbildung 4.3). Diese Messungen umfassen den Tag vor dem Eingriff, der als longitudinale Kontrolle dient, den Tag des Eingriffs selbst und die zwei nachfolgenden Tage. Die Tiere der Versuchs- und Kontrollgruppe weisen einen regelmäßigen Rhythmus der gemessenen Parameter auf. Auf die Inaktivitätsphase am Tag (Licht von 7 bis 19 Uhr) folgt eine biphasische Aktivitätsphase in der Nacht. Diese charakteristische Rhythmik kann bei Herzfrequenz, Körpertemperatur sowie Aktivität beobachtet werden. Die Störung der Schlafphase durch den Eingriff an Tag 0 ist in beiden Gruppen deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 4.3), ebenso die zeitliche Begrenzung dieser Störung auf ungefähr eine Stunde. Signifikante Unterschiede für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe können weder am Tag vor dem Eingriff (Tag -1) noch am Tag des Eingriffs selbst (Tag 0) festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde auf eine Signifikanzberechnung an den Tagen +1 und +2 verzichtet.



**Abbildung 4.1 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena saphena bei C57BL/6 Mäusen ( $n=10$ , rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.2 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena saphena bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.3 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Blutentnahme (Tag 0) aus der Vena saphena bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 4.1.2 Blutentnahme aus der Schwanzvene

Die Blutentnahme aus der Schwanzvene wurde in C57BL/6 und in BALB/c Mäusen durchgeführt.

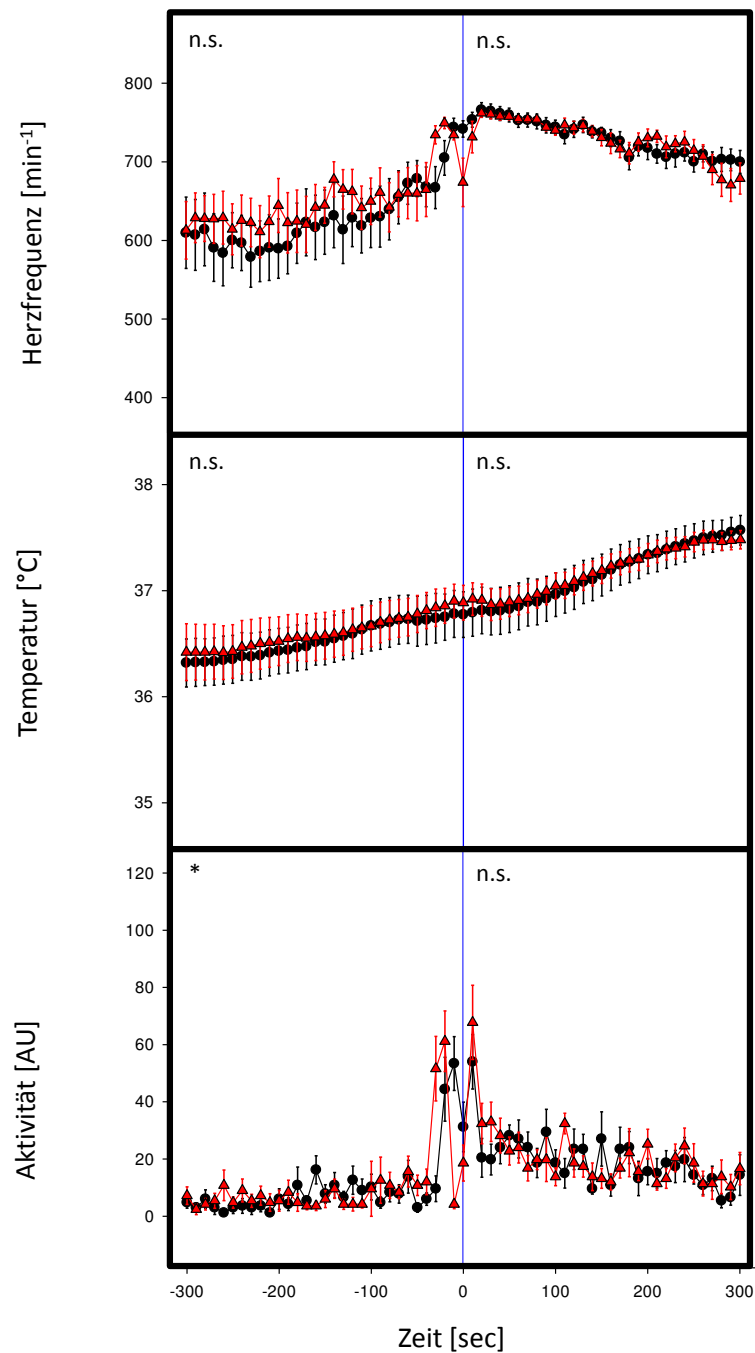
### C57BL/6

Die Kontrolltiere für die Blutentnahme aus der Schwanzvene zeigen bezüglich Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität in der *Akuten Phase* (Abbildung 4.4) einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Kontrollen der Vena saphena (Abschnitt 4.1.1). Auch hier entwickelt sich für die Herzfrequenz ein Plateau mit reduziertem Standardfehler, welches jedoch bereits früher abfällt.

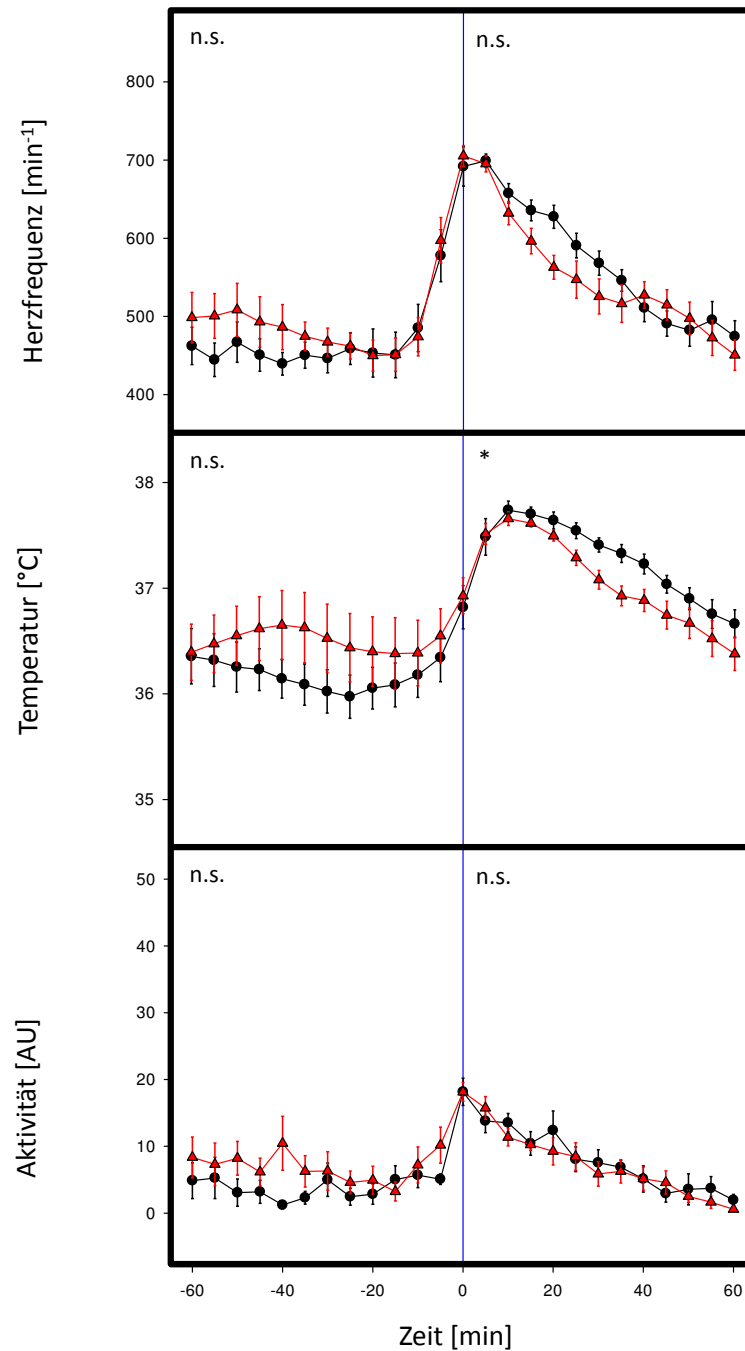
Einen statistischen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe (zeitraumspezifisch begrenzt) zeigt vor dem Eingriff lediglich die Aktivität. Nach der Manipulation können keine signifikanten Unterschiede zwischen alleiniger Fixierung oder zusätzlicher Blutentnahme für einen der drei Parameter festgestellt werden. Die signifikanten Unterschiede in der Aktivität vor dem Eingriff werden durch die Blutentnahme offensichtlich aufgehoben.

Auch die *Arousal Phase* (siehe Abbildung 4.5) stellt sich für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität der Kontrolltiere ähnlich dar wie bei der Blutentnahme aus der Vena saphena. Die statistischen Auswertungen für die Zeitphase vor dem Eingriff ergeben keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe. Nach dem Eingriff ist eine signifikante Minderung der Körpertemperatur bei den Tieren der Blutentnahmegruppe festzustellen.

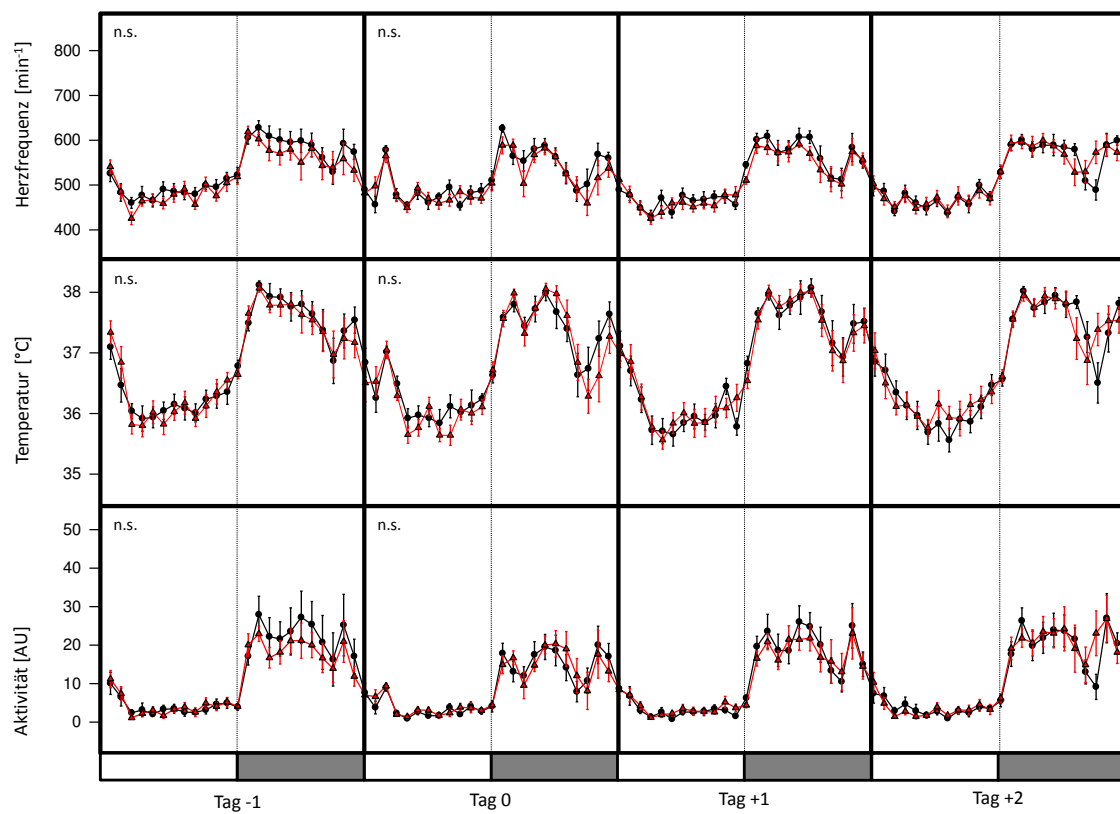
Der Kurvenverlauf bei Darstellung des *Tag/Nacht-Rhythmus* (siehe Abbildung 4.6) entspricht dem unter 4.1.1 beschriebenen. Abermals ist deutlich der Zeitpunkt des Eingriffs an Tag 0 zu erkennen. Statistisch signifikante Unterschiede der Herzfrequenz-, Temperatur- und Aktivitätswerte zwischen Blutentnahme- und Kontrolltieren liegen weder für Tag -1 noch für Tag 0 vor. Dementsprechend wurden keine Berechnungen mehr für die Tage +1 und +2 durchgeführt.



**Abbildung 4.4 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Schwanzvene bei C57BL/6 Mäusen ( $n=10$ , rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.5 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Schwanzvene bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.6 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Blutentnahme (Tag 0) aus der Schwanzvene bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.



## BALB/c

Der Kurvenverlauf von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität während der *Akuten Phase* ähnelt prinzipiell dem von B6 Mäusen, zeigt aber im Detail doch einige Abweichungen (Abbildung 4.7). Sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe sind weniger deutliche Anstiege der Herzfrequenz, Temperatur oder Aktivität als Folge der Blutentnahme bzw. der Fixierung erkennbar. Die Herzfrequenz der Kontrollgruppe erreicht maximale Werte in den ersten 60 Sekunden nach der Fixierung, bleibt aber mit ca. 680 Herzschlägen pro Minute sichtbar unter den entsprechenden Werten der B6 Mäuse. Ein deutlich ausgeprägtes Plateau der Herzfrequenz nach dem Eingriff fehlt ebenso wie der bei B6 Mäusen zu beobachtende niedrige Standardfehler.

Der Anstieg der Körpertemperatur in der Kontrollgruppe erfolgt schrittweise und über die komplette Beobachtungszeit hinweg.

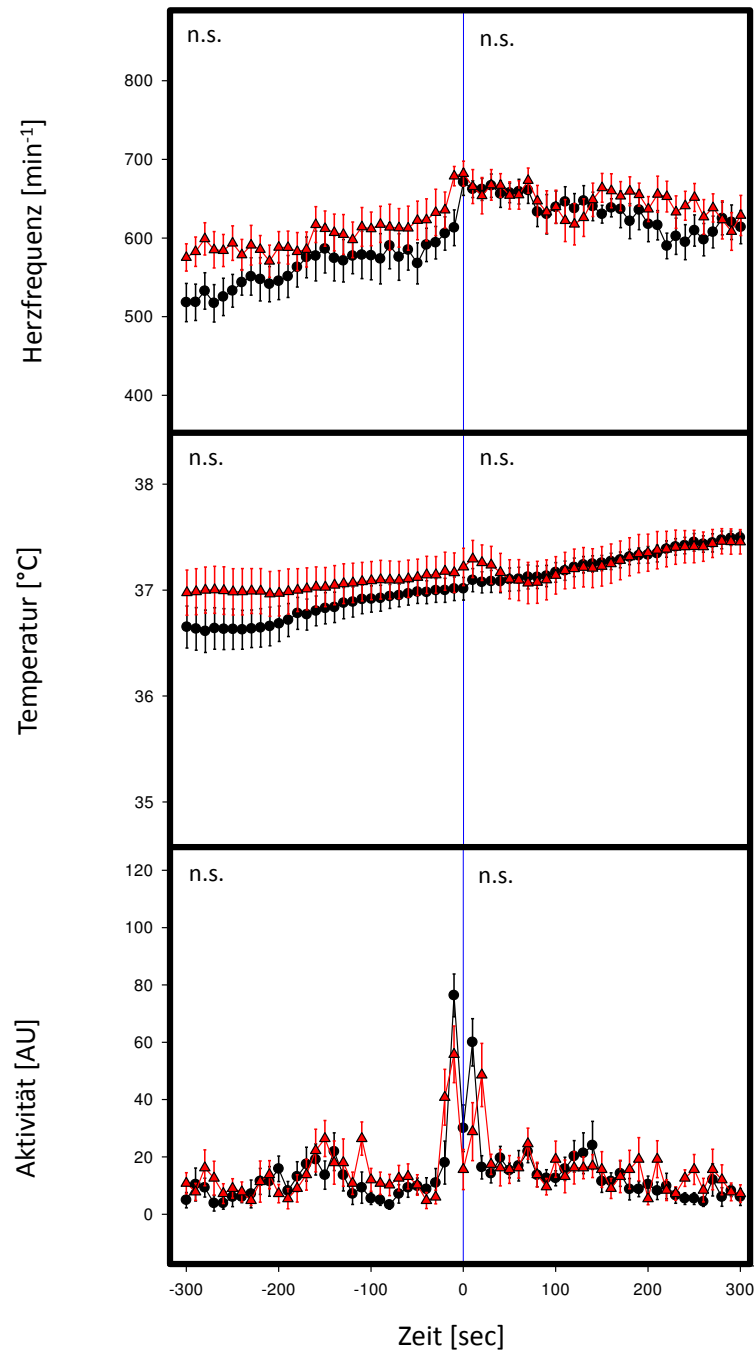
Eine erhöhte Aktivität ist um den Zeitpunkt der Fixierung zu erkennen. Anders als bei den B6 Mäusen, nimmt die Aktivität der BALB/c Mäuse innerhalb kurzer Zeit wieder ab und erreicht Werte, die vergleichbar sind mit denen vor dem Eingriff.

Für alle drei gemessenen Parameter können weder im Zeitraum vor dem Eingriff noch im Zeitraum nach dem Eingriff signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe festgestellt werden.

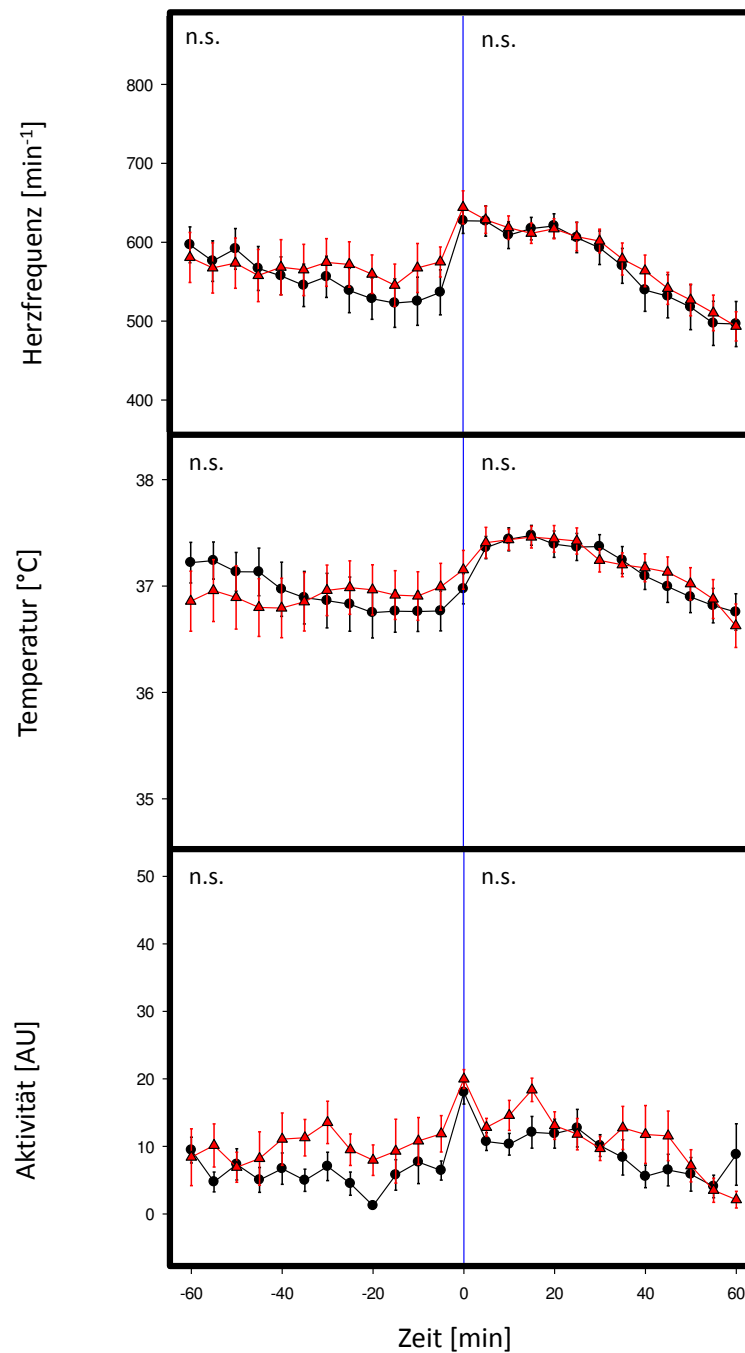
Die *Arousal Phase* (Abbildung 4.8) ist sowohl bei der Herzfrequenz als auch bei Körpertemperatur und Aktivität durch einen weniger prägnanten glockenförmigen Verlauf gekennzeichnet. Die Herzfrequenz der Kontrolltiere erreicht Höchstwerte zum Zeitpunkt der Fixierung. Die Rückkehr zu Ruhenniveau ist bereits vor Beendigung der Beobachtungsphase abgeschlossen. Etwas verzögert erreicht auch die Körpertemperatur maximale Werte die nur geringgradig über den Ruhewerten liegen. Eine gesteigerte Aktivität der BALB/c Kontrolltiere ist zum Zeitpunkt des Einfangens und Fixierens erkennbar. Die Kurvenverläufe der Blutentnahmegruppe unterscheiden sich nicht von denen der Kontrollgruppe.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind weder vor, noch nach der Manipulation für einen der Parameter messbar.

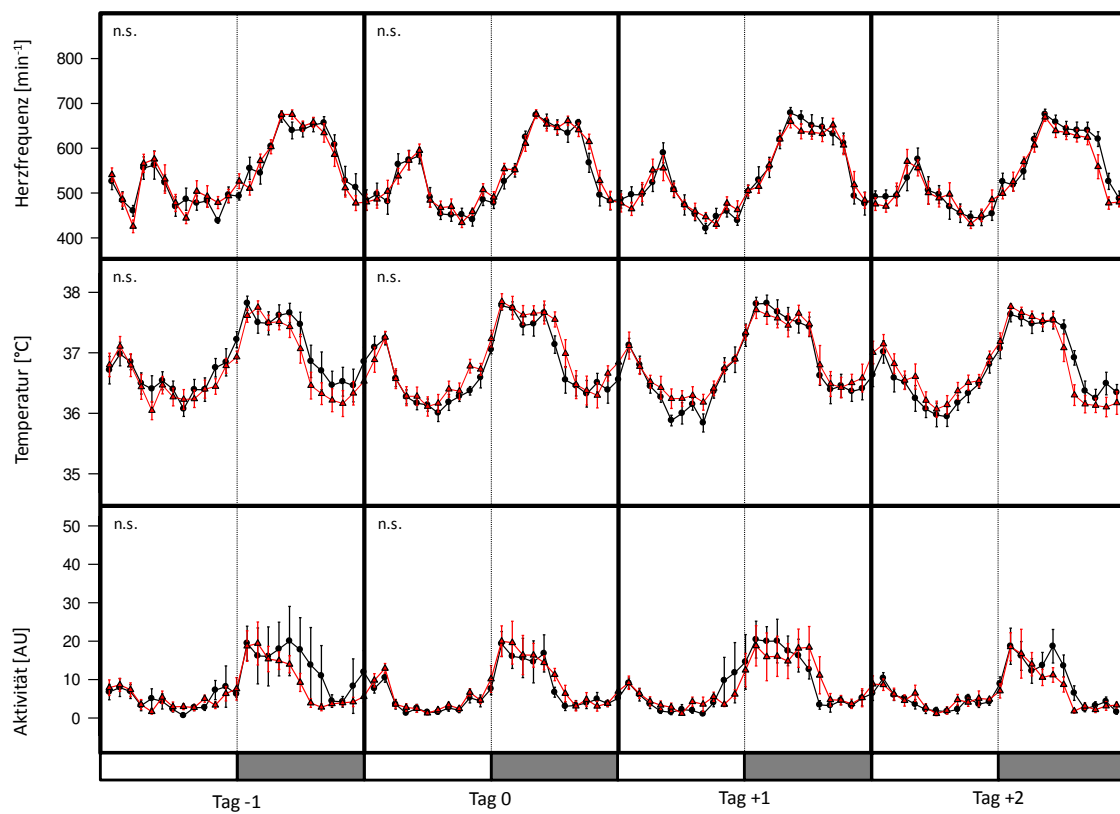
Der *Tag/Nacht-Rhythmus* (Abbildung 4.9) der BALB/c Mäuse unterscheidet sich für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität in einigen Punkten vom Verlauf bei den B6 Mäusen, unterliegt aber auch einem regelmäßigen Muster. Auffälligster Stammunterschied ist ein Anstieg aller gemessenen Parameter in der ersten Hälfte der Helligkeitsphase. Dieser Anstieg, der mit dem Zeitpunkt der Blutentnahme/Fixierung an Tag 0 übereinstimmt, ist an allen vier dargestellten Tagen zu beobachten. Die Fixierung bzw. Blutentnahme stellt sich somit in der Tag/Nacht-Rhythmik der BALB/c Mäuse nicht explizit dar. Der Kurvenverlauf von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität verhält sich in der Dunkelperiode nicht biphasisch und erreicht zudem höhere Werte als bei den B6 Mäusen. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe sind nicht messbar. Auf die statistischen Untersuchungen an den Tag +1 und +2 wurde deshalb verzichtet.



**Abbildung 4.7 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Schwanzvene bei BALB/c Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.8 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Schwanzvene bei BALB/c Mäusen ( $n=10$ , rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.9 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Blutentnahme (Tag 0) aus der Schwanzvene bei BALB/c Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.1.3 Blutentnahme aus der Vena facialis

Die Blutentnahme aus der Vena facialis wurde in C57BL/6 und in BALB/c Mäusen durchgeführt.

#### C57BL/6

Eine bloße Fixierung zur Blutentnahme aus der Vena facialis führt in der *Akuten Phase* zu einem ähnlichen Kurvenverlauf wie eine Fixierung zur Punktion der V. saphena oder der Schwanzvene. Der dort charakterisierte Verlauf trifft für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zu (siehe Abschnitt 4.1.1).

Die Mäuse der Versuchsgruppe zeigen jedoch nach dem Eingriff deutliche Unterschiede zu den Kontrollen (Abbildung 4.10). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Herzfrequenz, in Einzelfällen sogar auf 270 Herzschläge pro Minute. Wenige Sekunden später steigt die Herzfrequenz zwar für kurze Zeit wieder an, um anschließend aber für die restliche Beobachtungszeit deutlich unter die Werte der Kontrollen abzufallen. Hierbei handelt es sich um Differenzen zwischen den Mittelwerten beider Gruppen von bis zu 170 Herzschlägen pro Minute. Der im Vergleich zur Kontrollgruppe hohe Standardfehler der Experimentaltiere nach der Punktion deutet auf große Schwankungen der Herzfrequenz der einzelnen Tieren hin.

Auch der Verlauf der Körpertemperatur der an der Vena facialis punktierten Tiere unterscheidet sich in der akuten Phase deutlich von dem der Kontrollen und steigt während des Beobachtungszeitraums nur minimal an. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Aktivität von Versuchs- und Kontrolltiere in der akuten Phase kaum.

Vor der Manipulation sind keinerlei statistische Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe messbar. Signifikante Abweichungen zwischen beiden Gruppen nach dem Eingriff treten jedoch für alle Parameter auf. Anhand der Rohdaten lassen sich die 10 Tiere der Blutentnahmegruppe in zwei Teilgruppen mit jeweils 5 Tieren aufteilen (siehe Abbildung 4.11), wobei die eine Teilgruppe (1) insbesondere für die Herzfrequenz einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Kontrollgruppe zeigt. Kurz nach der Blutentnahme wird bei dieser Teilgruppe ein Plateau erreicht, das über die kompletten 5 Minuten anhält. Hierbei sind die interindividuellen Schwankungen deutlich reduziert. Bei Teilgruppe 2 hingegen tritt ein völlig anderer Kurvenverlauf in Erscheinung. In der Zeitspanne 100 bis 200 sec nach der Blutentnahme fällt hier die Herzfrequenz auf bis zu 440 Herzschläge pro Minute ab und liegt somit deutlich unter den gemessenen Werten vor der Blutentnahme. Diese Abweichungen zwischen beiden Teilgruppen betreffen ebenso, wenn auch weniger deutlich, Temperatur und Aktivität. In beiden Fällen liegen die Werte von Teilgruppe 2 erheblich unter denen von Teilgruppe 1 und Kontrolle.

In der *Arousal Phase* zeigt die Kontrollgruppe den schon mehrfach beschriebenen glockenförmigen Verlauf bei allen drei gemessenen Parametern (Abbildung 4.12). Aber auch in dieser Phase unterscheiden sich die Experimentaltiere deutlich von den

Kontrollen. Die Herzfrequenzwerte der Versuchstiere liegen zum Zeitpunkt 0 und +5 min im Einklang mit den Ergebnissen in der akuten Phase unterhalb denen der Kontrolltiere. Anschließend liegen die Werte jedoch konstant über den Kontrollwerten.

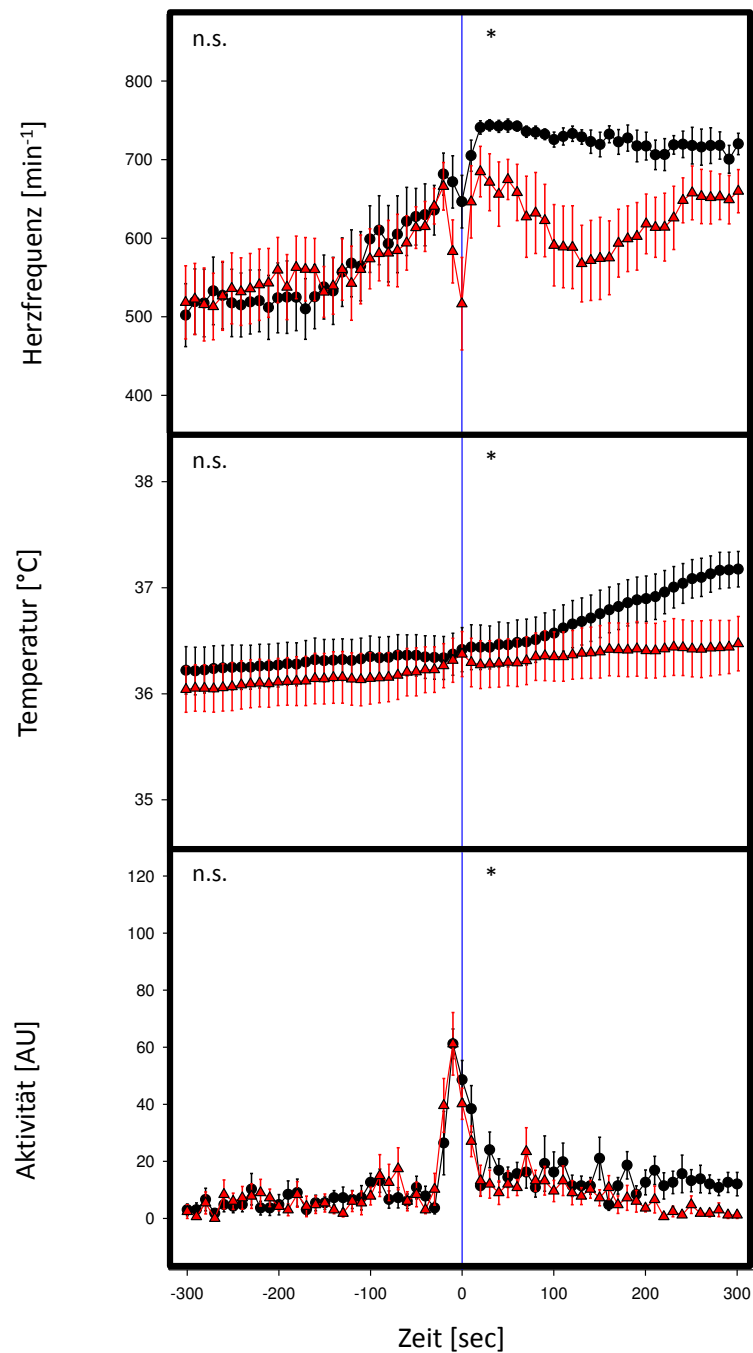
Die Körpertemperatur der Versuchsmäuse ist nach dem Eingriff deutlich niedriger als bei den Kontrollen und erreicht erst nach ca. 40 Minuten die Werte der Kontrolltiere.

Zum Zeitpunkt der Punktion ist eine reduzierte Aktivität in der Versuchsgruppe zu beobachten, 30 Minuten später jedoch tritt eine erhöhte Aktivität für ca. 20 Minuten auf.

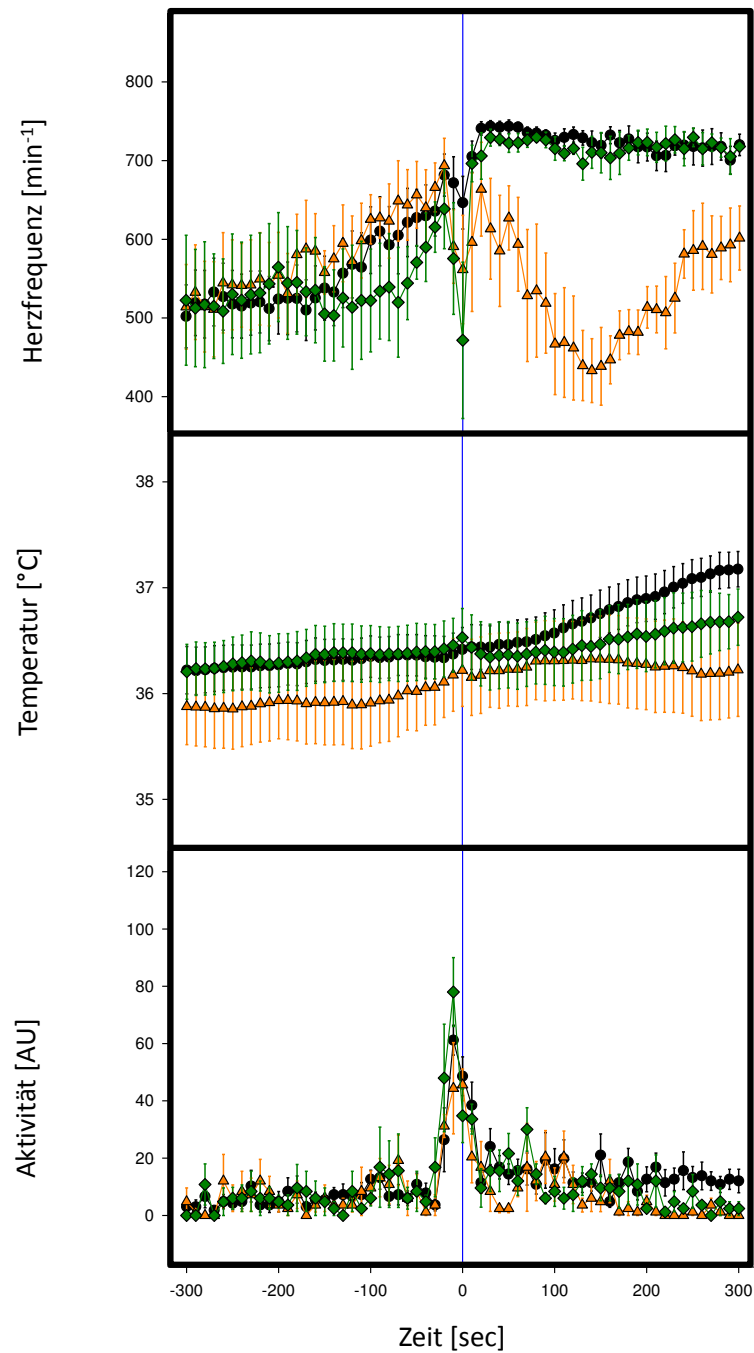
Die statistischen Untersuchungen können keine Signifikanzen vor dem Eingriff feststellen. Nach der Manipulation sind jedoch signifikante Unterschiede der Herzfrequenz und zeitraumspezifisch signifikante Unterschiede der Aktivität zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe messbar.

Betrachtet man wieder die in gleicherweise zusammengesetzten Teilgruppen (siehe Abbildung 4.13) erkennt man, dass Teilgruppe 1 sich in den ersten 5 Minuten wie die Kontrollgruppe verhält. Während die Herzfrequenz bei den Kontrollen jedoch bereits 5 Minuten nach der Blutentnahme abzufallen beginnt, bleibt Teilgruppe 1 weiterhin und über die komplette restliche Zeit erhöht. Das deutliche Absinken der Herzfrequenz über die ersten 5 Minuten bei Teilgruppe 2 in der akuten Phase wird auch in der Abbildung zur Arousal Phase nochmal deutlich sichtbar. Die Herzfrequenz steigt erst verzögert wieder an und bleibt insbesondere in den ersten 25 min unterhalb von Teilgruppe 1 aber damit immer noch höher als bei der dazugehörigen Kontrolle. Auch im Verlauf der Temperatur erkennt man Unterschiede zwischen beiden Teilgruppen. Unterschiede in der Aktivität zwischen beiden Teilgruppen bestehen nicht.

Der *Tag/Nacht-Rhythmus* (4.14) von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität der Kontrolltiere unterscheidet sich nicht von den bereits beschriebenen Kurvenverläufen der B6 Mäuse. Wiedermals ist deutlich der Zeitpunkt des Eingriffs an Tag 0 zu erkennen. Die Herzfrequenz der Versuchsgruppe ist, im Unterschied zur Kontrolle, auch die zweite Stunde nach dem Eingriff noch erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestehen weder für Herzfrequenz, Körpertemperatur oder Aktivität an Tag -1 oder Tag 0. Demzufolge wurde auf eine Signifikanzberechnung an den Tagen +1 und +2 verzichtet.

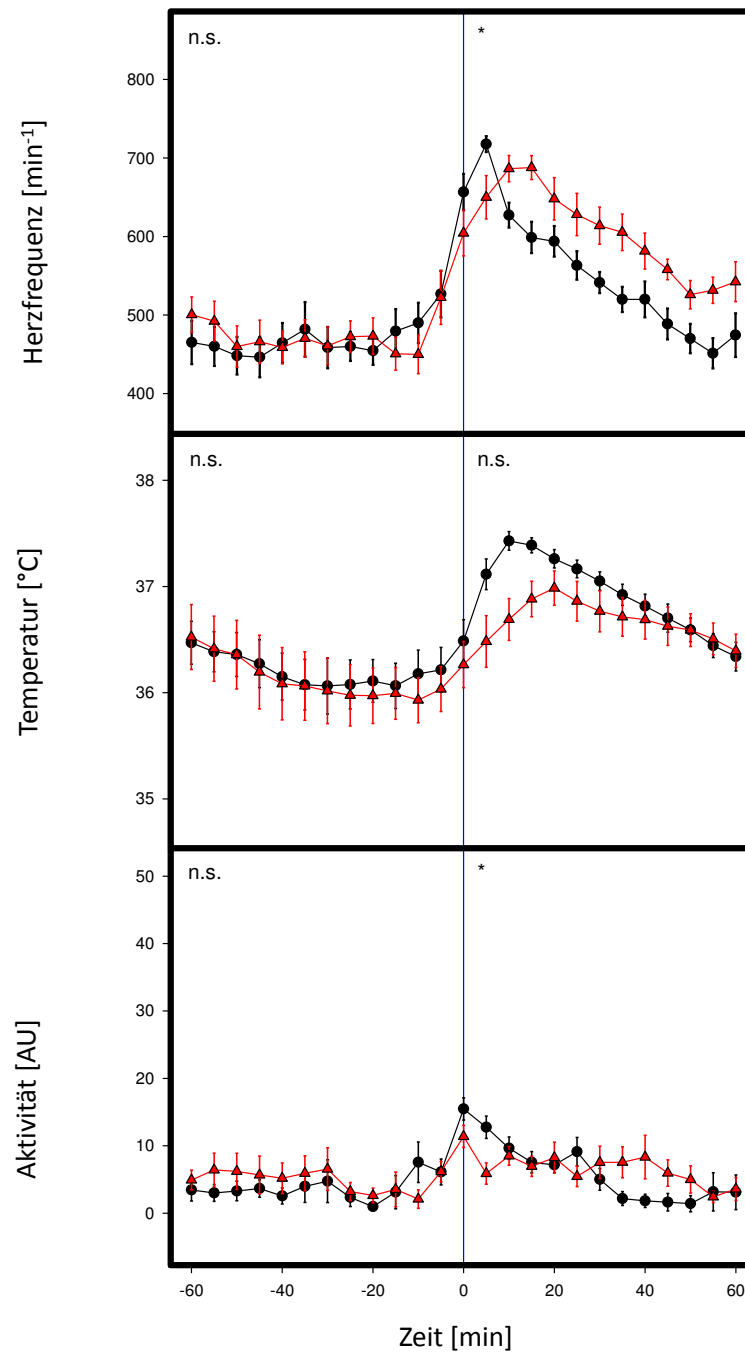


**Abbildung 4.10 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena facialis bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.

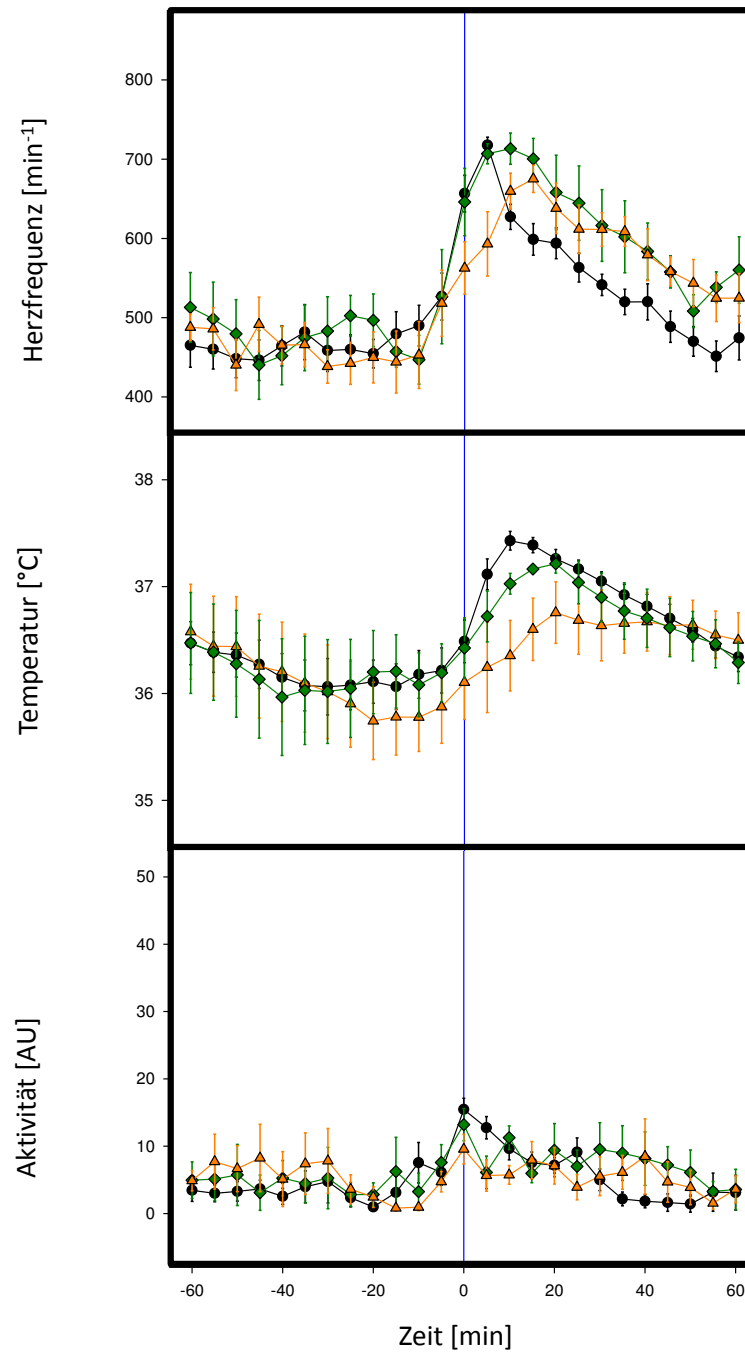


**Abbildung 4.11 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena facialis; dargestellt in Teilgruppen bei C57BL/6 Mäusen (grün=Teilgruppe 1 (n=5), gelb=Teilgruppe 2 (n=5), schwarz=Kontrolle (n=10)). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt der Punktion.

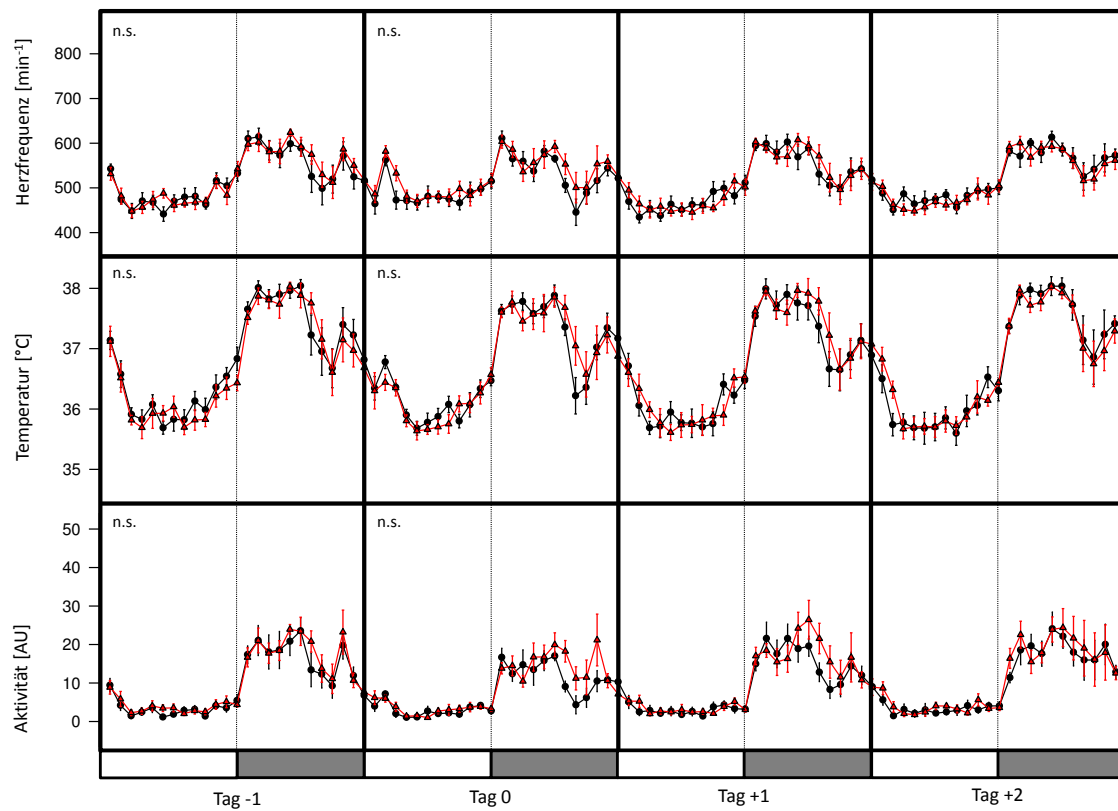




**Abbildung 4.12 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena facialis bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.13 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena facialis; dargestellt in Teilgruppen bei C57BL/6 Mäusen (grün=Teilgruppe 1 (n=5), gelb=Teilgruppe 2 (n=5), schwarz=Kontrolle (n=10)). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt der Punktion.



**Abbildung 4.14 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Blutentnahme (Tag 0) aus der Vena facialis bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

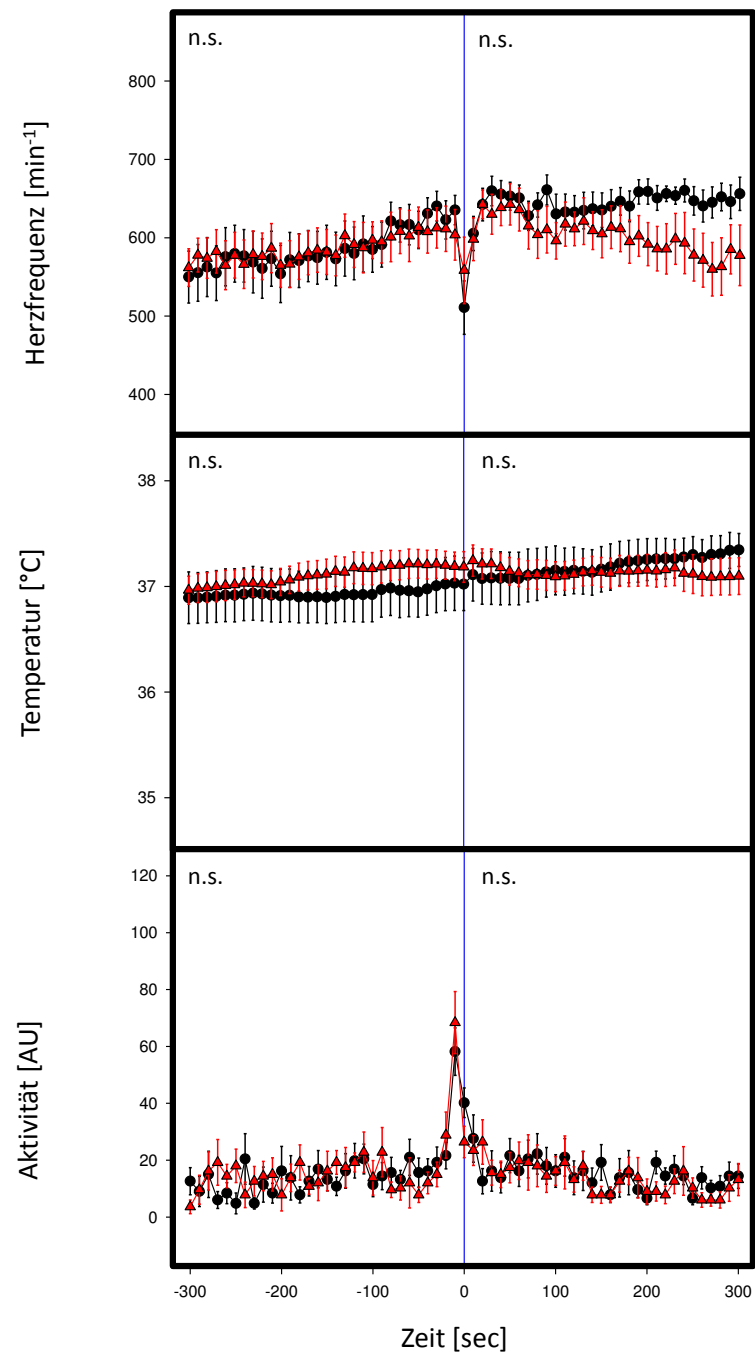
## BALB/c

In allen gemessenen Parametern (Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität) ähneln die Kurvenverläufe der BALB/c Kontrolle in der *Akuten Phase* den bereits für diesen Stamm in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Verläufen (Abbildung 4.15).

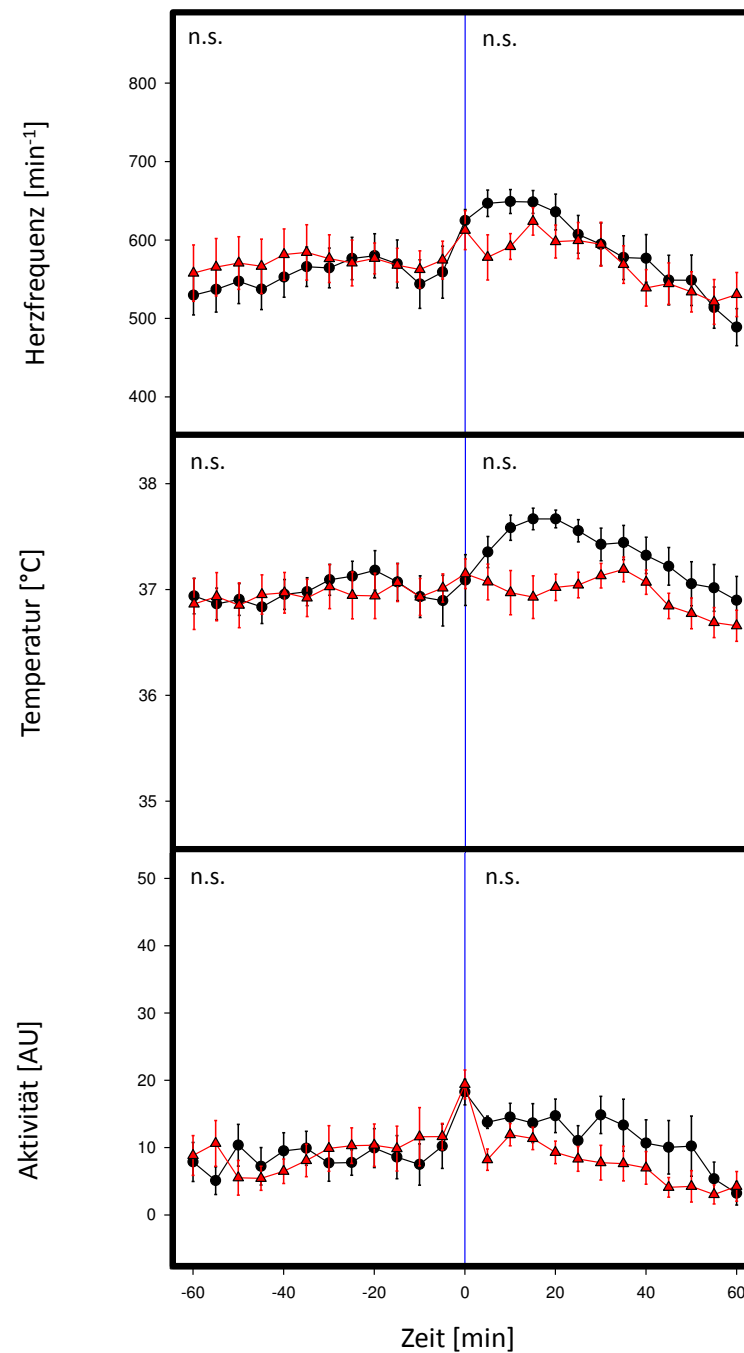
Anders als nach Blutentnahme aus der Schwanzvene kommt es bei Punktion der Vena facialis von BALB/c Mäusen zum Zeitpunkt 0 zu einem kurzfristigen aber deutlichen Absinken der Herzfrequenz bei beiden Gruppen. Geringgradige Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe treten nach dem Eingriff auf und betreffen überwiegend die Herzfrequenz. Anders als nach bloßer Fixierung kommt es nach Punktion der Vena facialis zu einem schrittweisen Absinken der Herzfrequenz. Temperatur und Aktivität unterscheiden sich kaum. Für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe im Zeitraum vor dem Eingriff und nach dem Eingriff messbar. Anhand der Rohdaten lassen sich zudem auch keine Teilgruppen bilden.

Auch in der *Arousal Phase* (Abbildung 4.16) zeigen die BALB/c Kontrollmäuse den für diesen Stamm typischen Verlauf. Eine reduzierte Herzfrequenz und Körpertemperatur in der Blutentnahmegruppe tritt insbesondere in den ersten ca. 20 Minuten auf, im Bereich der Aktivität über die komplette Zeit. Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität von Versuchs- und Kontrolltieren zeigen dennoch in keiner Zeitphase signifikanten Unterschiede.

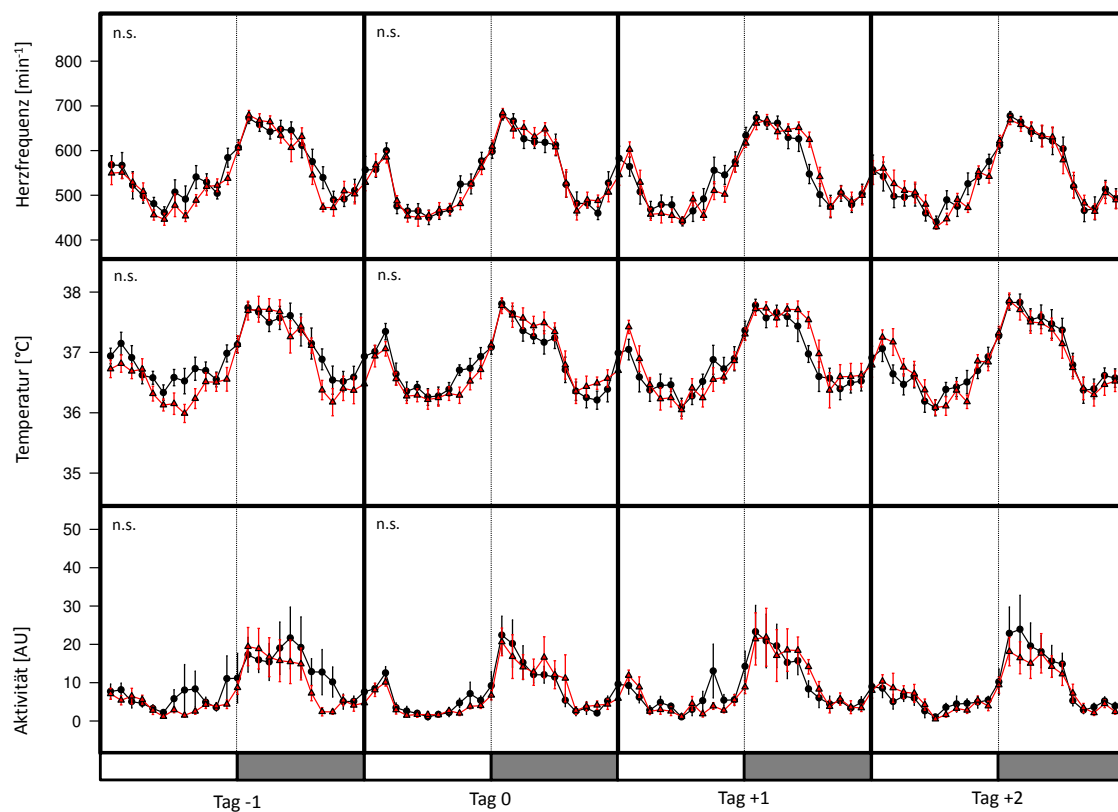
Der *Tag/Nacht-Rhythmus* (Abbildung 4.17) unterliegt für beide Gruppen einem regelmäßigen Verlauf über die gemessenen und dargestellten vier Tage. Vergleicht man ihn mit der Tag/Nacht-Rhythmik der BALB/c Mäuse nach Blutentnahme aus der Schwanzvene erkennt man, dass sich der Verlauf ähnelt, bei der Vena facialis aber etwas zeitlich versetzt wirkt. Wie schon bei Punktion der Schwanzvene zu beobachten ist, lässt sich der Zeitpunkt des Eingriffs nicht klar am Verlauf erkennen. Die statistische Untersuchung zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe zeigt keine Unterschiede an Tag -1 oder Tag 0 für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität, sodass auf eine Analyse der Tage +1 und +2 verzichtet wurde.



**Abbildung 4.15 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena facialis bei BALB/c Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.16 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus der Vena facialis bei BALB/c Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.17 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Blutentnahme (Tag 0) aus der Vena facialis bei BALB/c Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 4.1.4 Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus

### C57BL/6

Im Unterschied zu den anderen Techniken der Blutentnahme ist zur Punktion des retrobulbären Venenplexus eine kurze Inhalationsnarkose notwendig, die alle telemetrisch erfassten Parameter zusätzlich beeinflusst.

Der Verlauf der Herzfrequenz-, Körpertemperatur- und Aktivitätswerte der Kontrollgruppe unterscheidet sich in der *Akuten Phase* durch die Narkose deutlich von den bisher beschriebenen (siehe Abbildung 4.18). Die Herzfrequenz steigt in Vorbereitung des Eingriffs zunächst an, fällt aber nach Einsetzen der Narkose rapide ab. Unmittelbar nach dem Zeitpunkt der Blutentnahme (Nulllinie) wurde die Narkosegaszufuhr sofort beendet, wodurch es zu einem raschen Anstieg der Herzfrequenz kommt. Hierbei erreichen die Werte in der Kontrollgruppe jedoch nicht die gleiche Höhe wie zum Zeitpunkt der Vorbereitung. Im Unterschied zu anderen Methoden der Blutentnahme ist der Standardfehler in der Kontrollgruppe nach der Manipulation weiterhin erhöht. Diese Gruppe weist vielmehr eine kurze Phase vor dem Einriff auf, die durch einen niedrigen SEM geprägt ist.

Temperatur- und Aktivitätswerte der Kontrollmäuse zeigen ebenfalls ein Absinken vor der Nulllinie. Die Aktivität ist nach dem Eingriff über die gesamte Beobachtungszeit erhöht, wobei die Aktivitäts deutlich über dem bisher beschriebenen Niveau nach anderen Formen der Blutentnahme liegt.

Die Herzfrequenz in der Blutentnahmegruppe erreicht nach der Punktion des Venenplexus höhere Werte als die entsprechende Kontrolle, der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant. Die Körpertemperatur der gebluteten Tiere hingegen fällt stärker und über längerer Zeit ab als dies nach bloßer Fixierung und Narkose der Fall ist. Dieser sichtbare Unterschied ist auch statistisch signifikant. Signifikante Unterschiede in der Aktivität bestehen nicht.

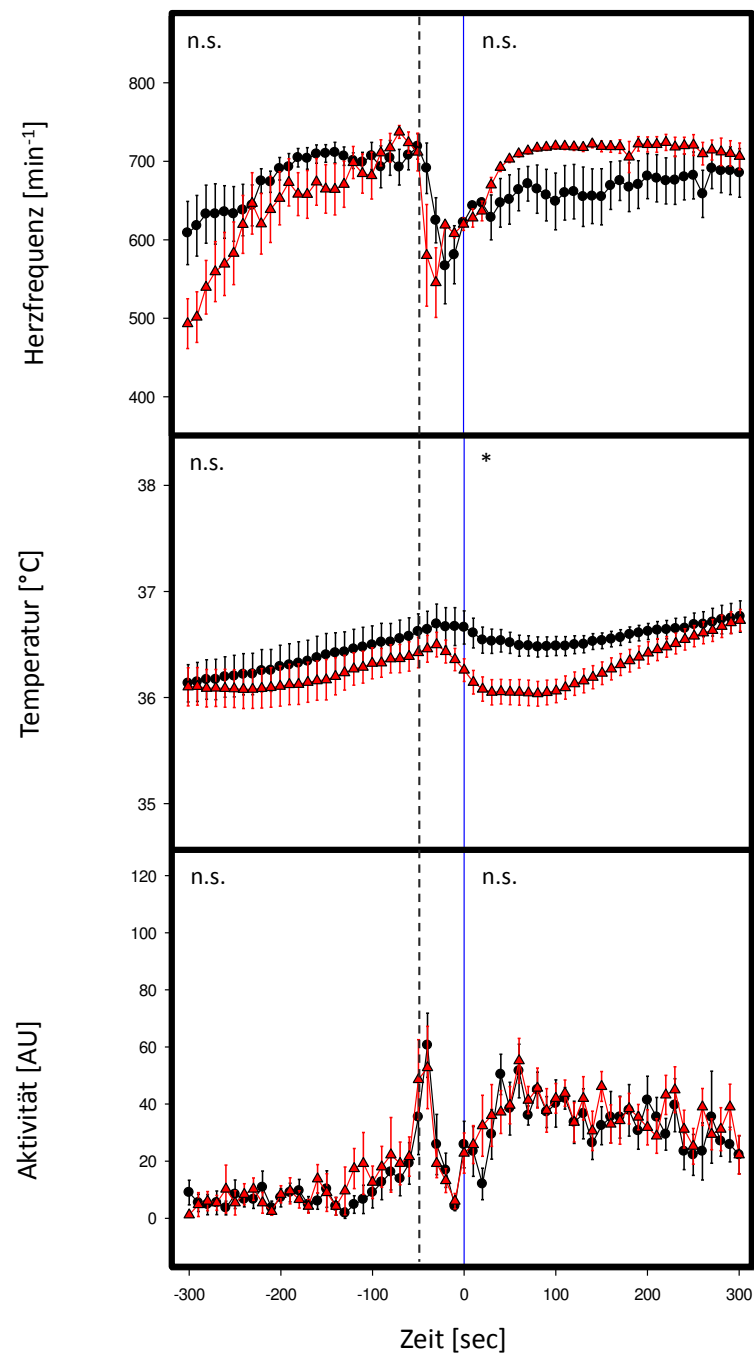
Zusammenfassend sind vor dem Eingriff keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellbar, nach der Punktion ist die Körpertemperatur in der Blutentnahmegruppe signifikant erniedrigt.

In der *Arousal Phase* (Abbildung 4.19) zeigen Herzfrequenz und Temperatur der Kontroll- und Versuchstiere den üblichen glockenförmigen Verlauf. Die Aktivität verläuft ähnlich, behält nach dem Eingriff jedoch ein erhöhtes Niveau bei. Die statistischen Untersuchungen ergeben eine zeitraumspezifisch signifikante Erhöhung der Körpertemperatur der Blutentnahmegruppe vor dem Eingriff. Nach der Manipulation sind für Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

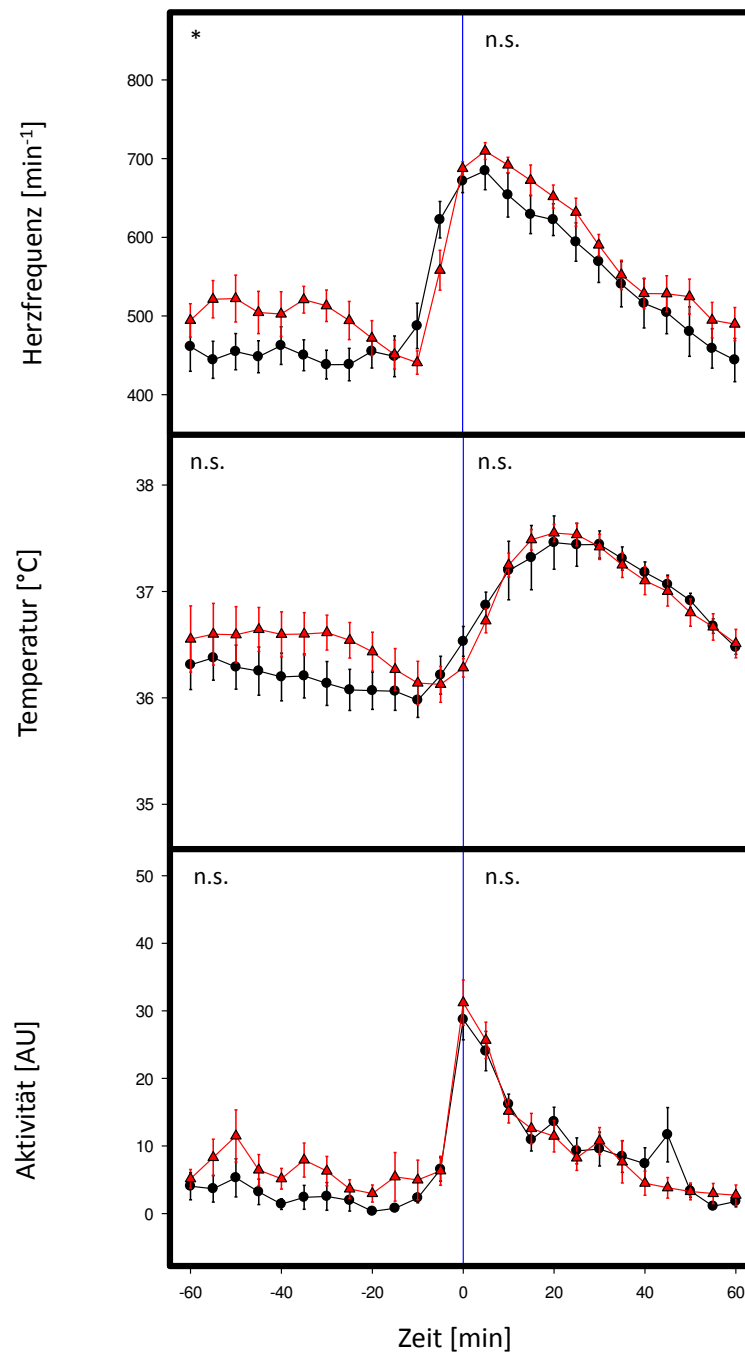
Der *Tag/Nacht-Rhythmus* der Kontrollgruppe entspricht für alle drei Parameter der bisher beschriebenen Verlaufsform bei B6 Mäusen (Abbildung 4.20). Man erkennt deutlich den Zeitpunkt des Eingriffs an Tag 0. Die Blutentnahme aus dem retrobul-



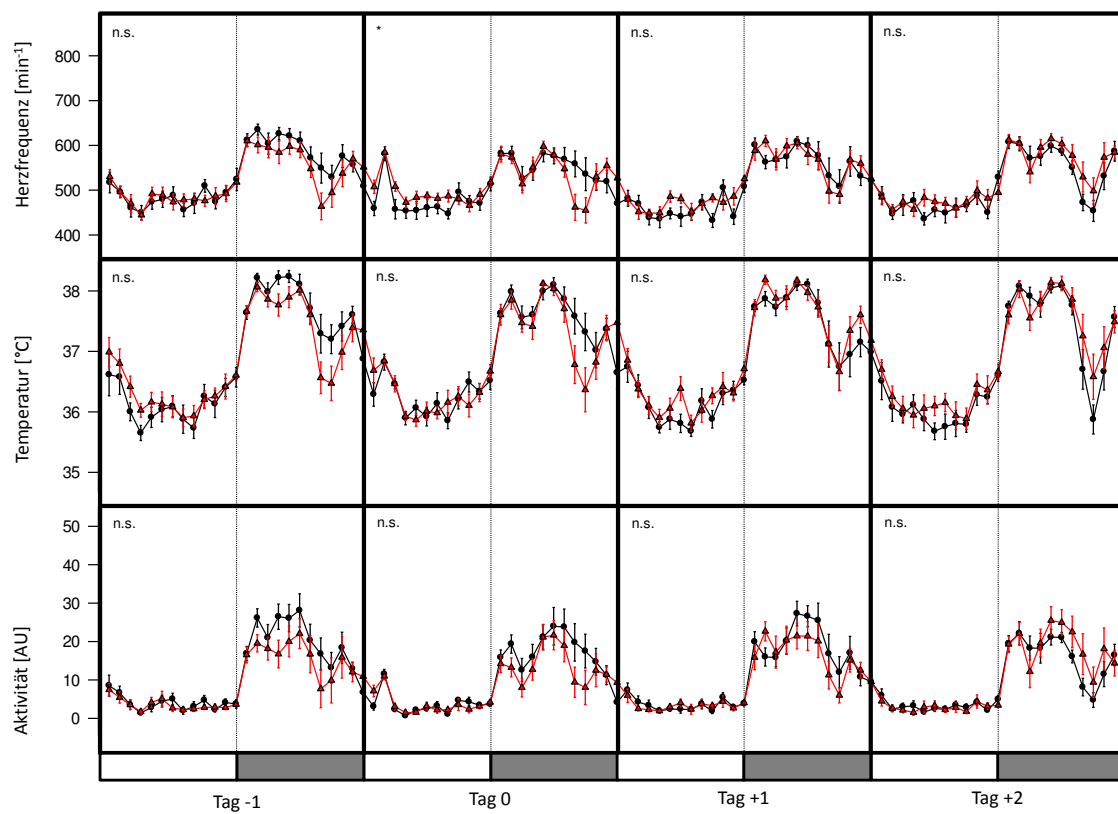
bären Venenplexus führt zu signifikant erhöhten Herzfrequenzen der Versuchstiere in der Helligkeitsphase von Tag 0. Für Tag -1 sowie +1 und +2 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der Herzfrequenz zwischen Experimental- und Kontrolltieren. Körpertemperatur und Aktivität zeigen an keinem der untersuchten Tage signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen.



**Abbildung 4.18 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die gestrichelte Linie zeigt den Narkosebeginn, die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.19 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt 0 der Punktion bzw. der Fixierung.



**Abbildung 4.20 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Blutentnahme (Tag 0) aus dem retrobulbären Venenplexus bei C57BL/6 Mäusen (n=10, rot=Blutentnahme, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 4.1.5 Statistik

**Tabelle 4.1 :** Statistische Ergebnisse der Blutentnahme ( $p < 0,05$ ;  $n = 10$ , n.s.=nicht signifikant,  $s^1$ =signifikanter Unterschied,  $s^2$ =zeitraumsspezifisch signifikanter Unterschied; prä/post= Zeitphase vor/nach dem Eingriff bzw. Tag -1/0)

B6		V. saphena					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Akute Phase	n.s.	$s^1$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Arousal Phase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Tag/Nacht-Rhythmus	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		Schwanzvene					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Akute Phase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$s^2$	n.s.
	Arousal Phase	n.s.	n.s.	n.s.	$s^1$	n.s.	n.s.
	Tag/Nacht-Rhythmus	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		V. facialis					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Akute Phase	n.s.	$s^1$	n.s.	$s^2$	n.s.	$s^1$
	Arousal Phase	n.s.	$s^1$	n.s.	n.s.	n.s.	$s^2$
	Tag/Nacht-Rhythmus	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		retrobulbärer Venenplexus					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Akute Phase	n.s.	n.s.	n.s.	$s^1$	n.s.	n.s.
	Arousal Phase	$s^2$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Tag/Nacht-Rhythmus	n.s.	$s^2$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
BALB/c		Schwanzvene					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Akute Phase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Arousal Phase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Tag/Nacht-Rhythmus	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		V. facialis					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Akute Phase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Arousal Phase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Tag/Nacht-Rhythmus	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

## 4.2 Verschiedene Methoden der Kennzeichnung

Alle Experimente wurden ausschließlich mit C57BL/6 Tieren durchgeführt.

### 4.2.1 Kennzeichnung mittels Ohrmarkierung (Ohrloch, Ohrmarke, RapID)

Für die Kennzeichnung der Tiere mittels der beschriebenen drei verschiedenen Formen der Ohrmarkierung ist stets die selbe Art der Fixierung notwendig. Aus diesem Grund wurde nur eine Kontrollgruppe mitgeführt und die Ergebnisse in einer Abbildung zusammengefasst.

#### Setzen der Ohrmarkierung

Die Reaktion der Kontrollgruppe auf das Setzen der Ohrkennzeichnung in der *Akuten Phase* ähnelt dem Reaktionsmuster, das bei den verschiedenen Methoden der Blutentnahme beschrieben wurde. Bereits vor dem Eingriff steigt die Herzfrequenz sukzessive an. Zum Zeitpunkt 0 kommt es zu einem deutlichen Absinken der Herzfrequenz (Abbildung 4.21). Kurz darauf steigt die Herzfrequenz erneut an und erreicht ein Plateau mit niedrigem Standardfehler über die kompletten 300 Sekunden. Temperatur und Aktivität der Kontrollgruppe verlaufen wie im Abschnitt Blutentnahme bereits beschrieben. Der Kurvenverlauf sämtlicher Versuchsgruppen (Ohrloch, Ohrmarke, RapID) ähnelt überwiegend dem Verlauf in der Kontrollgruppe. Auffällig ist lediglich, dass die Tiere, die mit einer Ohrmarke gekennzeichnet wurden, erst etwas verzögert die gleichen Herzfrequenzwerte wie die Kontrollen erreichen. Signifikante Unterschiede vor der Kennzeichnung bestehen zeitraumspezifisch für die Parameter Herzfrequenz und Körpertemperatur zwischen RapID- und Kontrollgruppe. Nach der Kennzeichnung liegt nur noch ein zeitraumspezifisch signifikanter Unterschied für die Körpertemperatur zwischen diesen beiden Gruppen vor. Der signifikante Unterschied zur Kontrolle, den die RapID Tiere bei der Körpertemperatur aufweisen, ist schwierig zu interpretieren, da diese Gruppen bereits vor der Manipulation einen signifikanten Unterschied aufweisen.

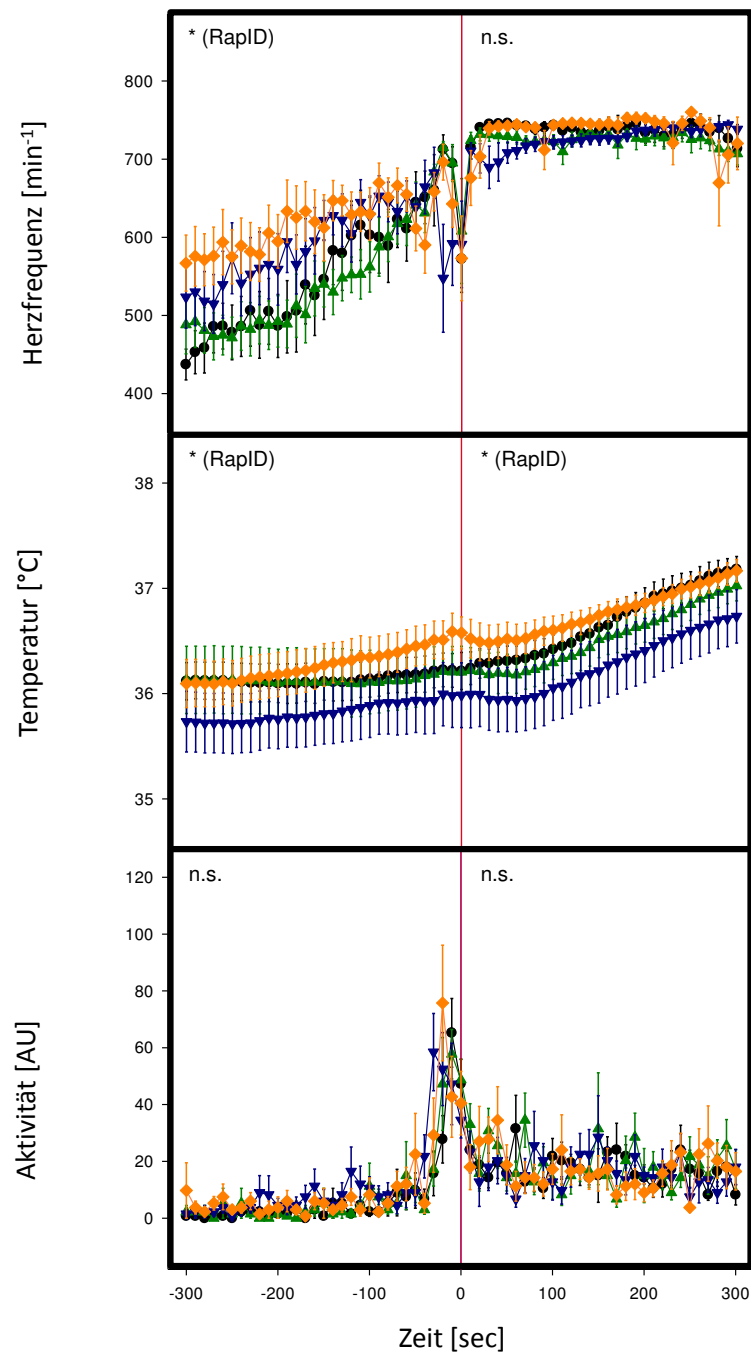
Betrachtet man die Kontrollgruppe in der *Arousal Phase* (Abbildung 4.22) zeigt sich auch hier der deutliche Anstieg aller drei Parameter durch das Setzen der Kennzeichnung. Der glockenförmige Kurvenverlauf entspricht im Allgemeinen dem im Rahmen der Blutentnahme an vorherigen Stellen beschriebenen. Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität in der Versuchsgruppe, die mittels Ohrloch gekennzeichnet wurde, unterscheiden sich nicht signifikant von den Werten der Kontrollgruppe. Anders verhält es sich mit den beiden Gruppen die mittels Ohrmarke bzw. RapID markiert wurden. Bei beiden ist der Parameter Herzfrequenz auch eine Stunde nach

der Kennzeichnung immer noch erhöht. Insbesondere die Tiere aus der Ohrmarkengruppe zeigen noch deutlich erhöhte Werte nach 60 Minuten. Die Tiere, die mit der RapID markiert wurden, erreichen ihr Ruheniveau nach 120 Minuten. Bei den Tieren, denen eine Ohrmarke gesetzt wurde, haben sich die Werte auch in dieser Zeitspanne noch immer nicht normalisiert. Die Körpertemperatur der Ohrmarkengruppe besitzt 30 Minuten nach der Kennzeichnung höhere Werte, welche den kompletten Abbildungszeitraum von 120 Minuten anhalten. Signifikante Unterschiede in der Aktivität sind zwischen einzelnen Versuchsgruppen und der Kontrolle nicht zu erkennen.

Zusammenfassend ergeben sich im Zeitraum vor der Kennzeichnung nur signifikante Abweichungen der Aktivität zwischen Ohrloch- und Kontrollgruppe. Nach dem Eingriff sind über 120 Minuten signifikant erhöhte Herzfrequenzen zwischen Ohrmarken- und Kontrollgruppe sowie zwischen RapID- und Kontrollgruppe messbar. Die Körpertemperatur der Ohrmarkengruppe ist über 60 min signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle.

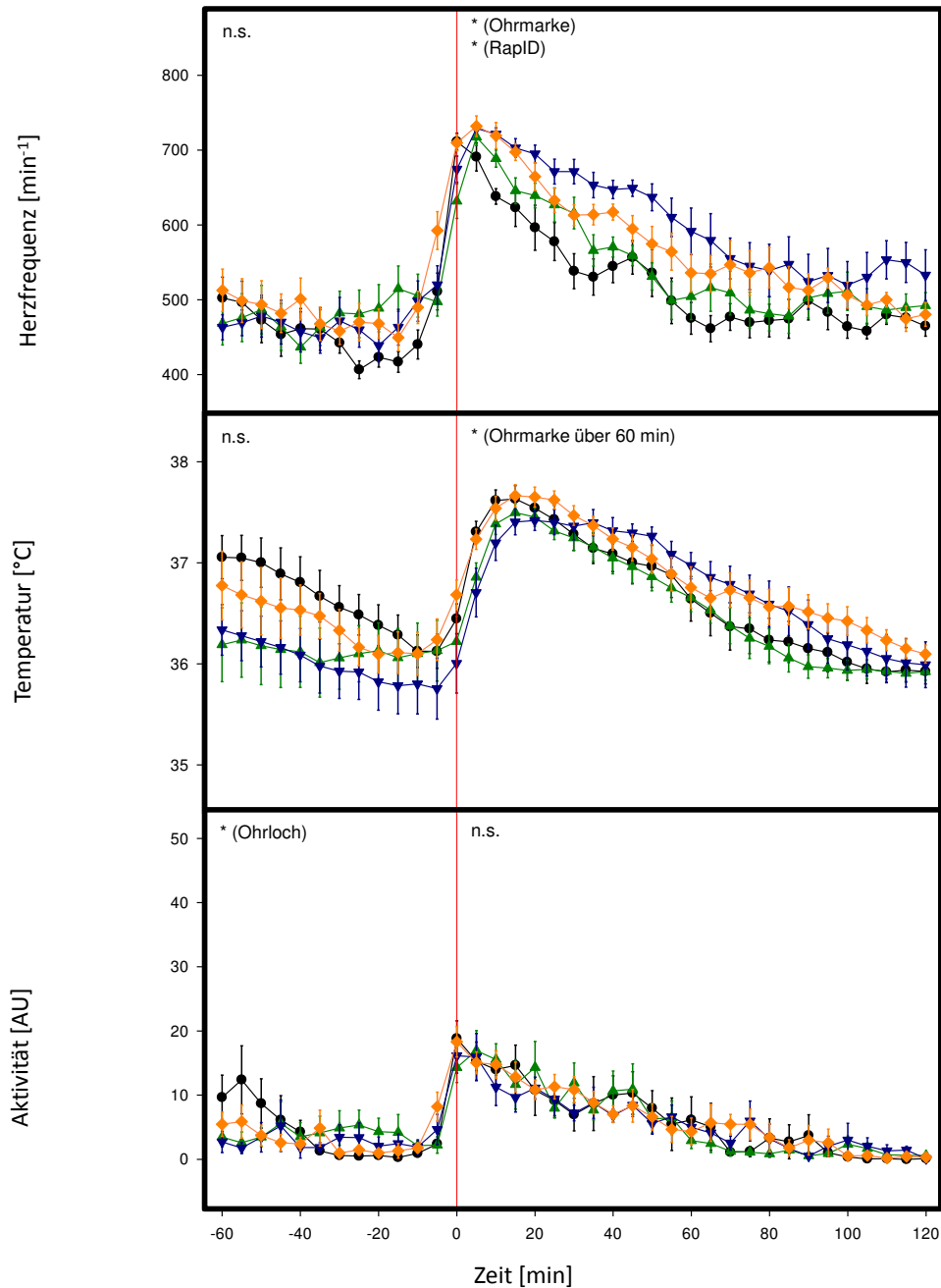
Die *Tag/Nacht-Rhythmen* (Abbildung 4.23) von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität der Kontrollgruppe verlaufen ähnlich wie bei den Blutentnahmen der C57BL/6 Tiere jeweils beschrieben. Wie dort auch (z.B. Abbildung 4.3), ist der Zeitpunkt des Eingriffs an Tag 0 deutlich zu erkennen. Einen vergleichbaren Kurvenverlauf zeigen die Tiere, die mittels Ohrloch und RapID markiert wurden. Die Mäuse, denen eine Ohrmarke gesetzt wurde, zeigen über die komplette Helligkeitsperiode von Tag 0 höhere Herzfrequenzen als die Kontrolle. Ihre Aktivität ist in der Nacht jedoch deutlich erniedrigt. Die Erhöhung der Herzfrequenz setzt sich nicht über die nachfolgenden Tage fort. Ein deutlicher Temperaturanstieg zum Zeitpunkt des Eingriffs wie in der Kontrollgruppe ist lediglich nach Kennzeichnung mittels RapID zu verzeichnen.

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen am Tag vor der Kennzeichnung (Tag -1) für keine der Versuchsgruppen vor. Dies gilt für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität. Ein zeitraumspezifisch signifikanter Unterschied kann zwischen Ohrmarken- und Kontrollgruppe für alle drei gemessenen Parameter am Tag der Kennzeichnung (Tag 0) festgestellt werden. Eine Erweiterung der statistischen Untersuchungen auf die Tag +1 und +2, zeigt jedoch keine Unterschiede mehr zwischen beiden Gruppen.

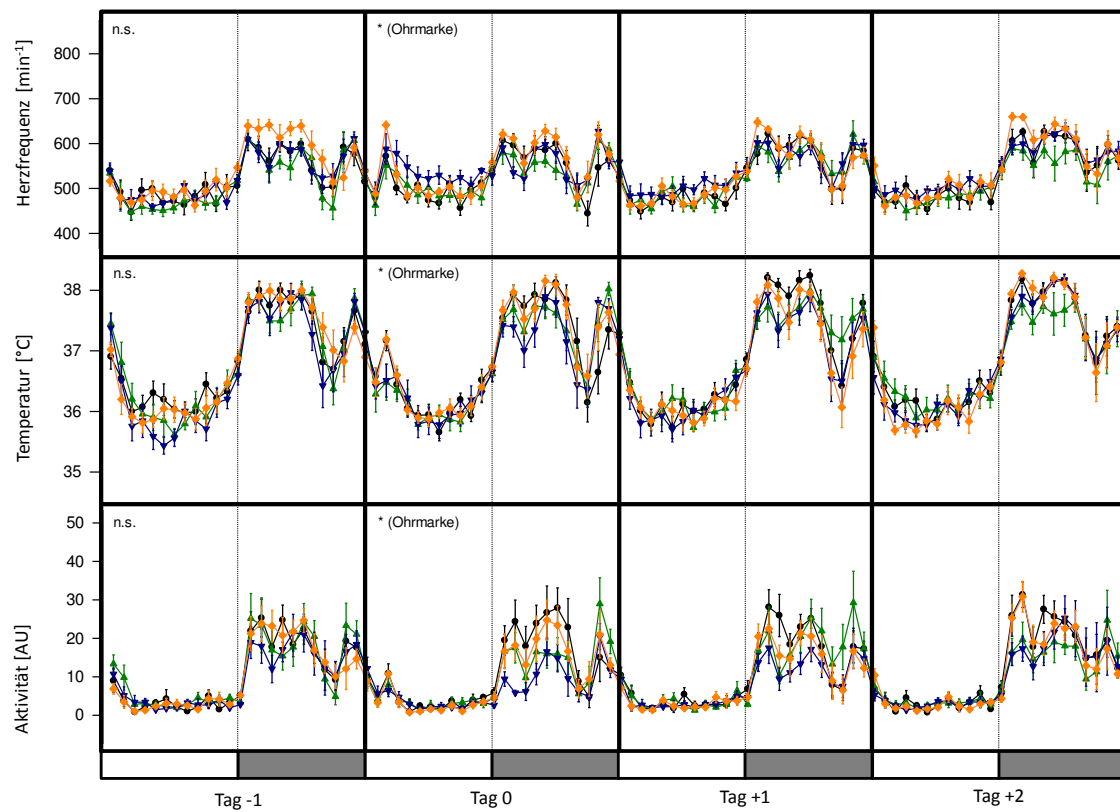


**Abbildung 4.21 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Kennzeichnung mittels Ohrloch, Ohrmarke und RapID bei C57BL/6 (n=8, grün=Ohrloch, blau=Ohrmarke, gelb=RapID, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die rote Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.





**Abbildung 4.22 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Kennzeichnung mittels Ohrloch, Ohrmarke und RapID bei C57BL/6 (n=8, grün=Ohrloch, blau=Ohrmarke, gelb=RapID, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die rote Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.



**Abbildung 4.23 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Kennzeichnung (Tag 0) mittels Ohrloch, Ohrmarke und RapID bei C57BL/6 (n=8, grün=Ohrloch, blau=Ohrmarke, gelb=RapID, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Lesen der Ohrmarkierung

Zur Ablesung wurde bei den Kontrollen lediglich der Käfigdeckel abgehoben, die Mäuse mit Ohrlochung wurden für einige Sekunden auf den Käfigdeckel gesetzt und die Tiere der Ohrmarken- und RapID-Gruppe im Nackengriff fixiert (siehe hierzu auch Abschnitt 3.3.2).

Die Kontrollgruppe (Käfigdeckel offen) reagiert in der *Akuten Phase* auf das AbleSEN mit einem ähnlichen Verlauf von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität wie auf das Setzen. Anders als dort, fällt das Plateau der Herzfrequenz aber bereits nach 150 sec schrittweise ab (Abbildung 4.24). Ohrloch- (auf Käfigdeckel gesetzt) sowie Ohrmarken- und RapID-Gruppe (Nackengriff) zeigen einen tendenziell ähnlichen Verlauf. Die Teilgruppen die zum Lesen im Nackengriff fixiert werden mussten (Ohrmarke und RapID) reagieren zum Zeitpunkt 0 mit einem kurzfristigen Absinken der Herzfrequenz, die kurz darauf erneut ansteigt. Alle drei Versuchsgruppen zeigen schon vor Ende der Beobachtungsphase eine deutliche Abnahme der Herzfrequenz.

Im Zeitraum vor dem AbleSEN sind zeitraumsspezifisch signifikante Unterschiede in der Aktivität zwischen Ohrmarken- und Kontrollgruppe sowie zwischen RapID- und Kontrollgruppe festzustellen. Untersuchungen für die Zeitphase nach dem Eingriff zeigen zeitraumsspezifisch signifikante Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen dem AbleSEN der Ohrmarke und der Kontrolle.

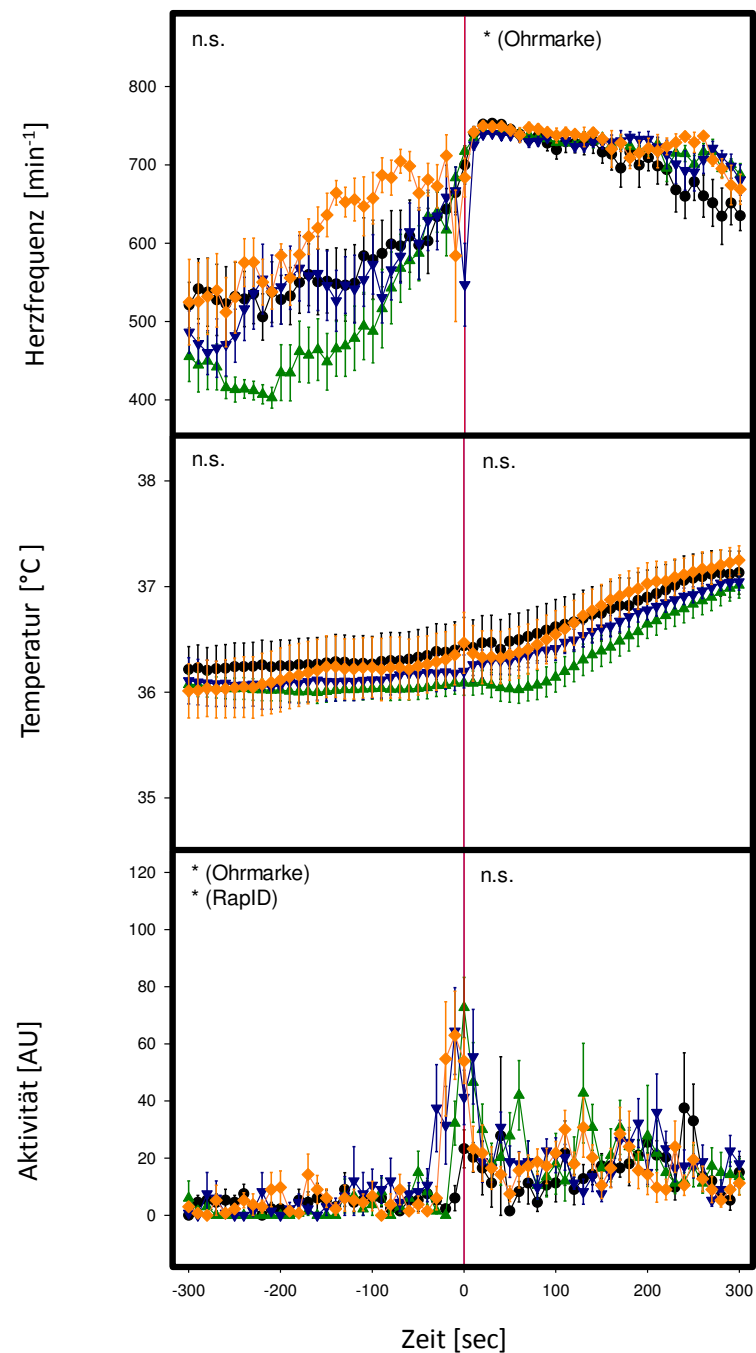
In der *Arousal Phase* unterscheidet sich der Kurvenverlauf für die Kontrollgruppe nur unwesentlich von der Reaktion auf das Fixieren im Rahmen des Setzens (Abbildung 4.25). Gleiches gilt für die drei Versuchsgruppen. Vor dem AbleSEN sind bezüglich aller Parameter keine statistischen Unterschiede feststellbar. Nach dem AbleSEN können zeitraumsspezifisch signifikante Unterschiede zwischen Ohrloch- (auf Käfigdeckel gesetzt) und Kontrollgruppe (Käfigdeckel offen) für Herzfrequenz und Körpertemperatur festgestellt werden.

Der *Tag/Nacht-Rhythmus* von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität aller vier Gruppen unterscheidet sich kaum von den bisher beschriebenen, wobei auch hier der Eingriff an Tag 0 deutlich bei allen Parametern zu erkennen ist (Abbildung 4.26). Am Tag vor dem Eingriff sind bereits signifikante Unterschiede in der Körpertemperatur zwischen Ohrmarkengruppe und Kontrolle festzustellen. An Tag 0 können ebenfalls signifikante Unterschiede der Körpertemperatur und auch der Aktivität zwischen Ohrmarken- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine Erweiterung der statistischen Untersuchung auf die Tage +1 und +2 zeigt aber keine Unterschiede mehr.

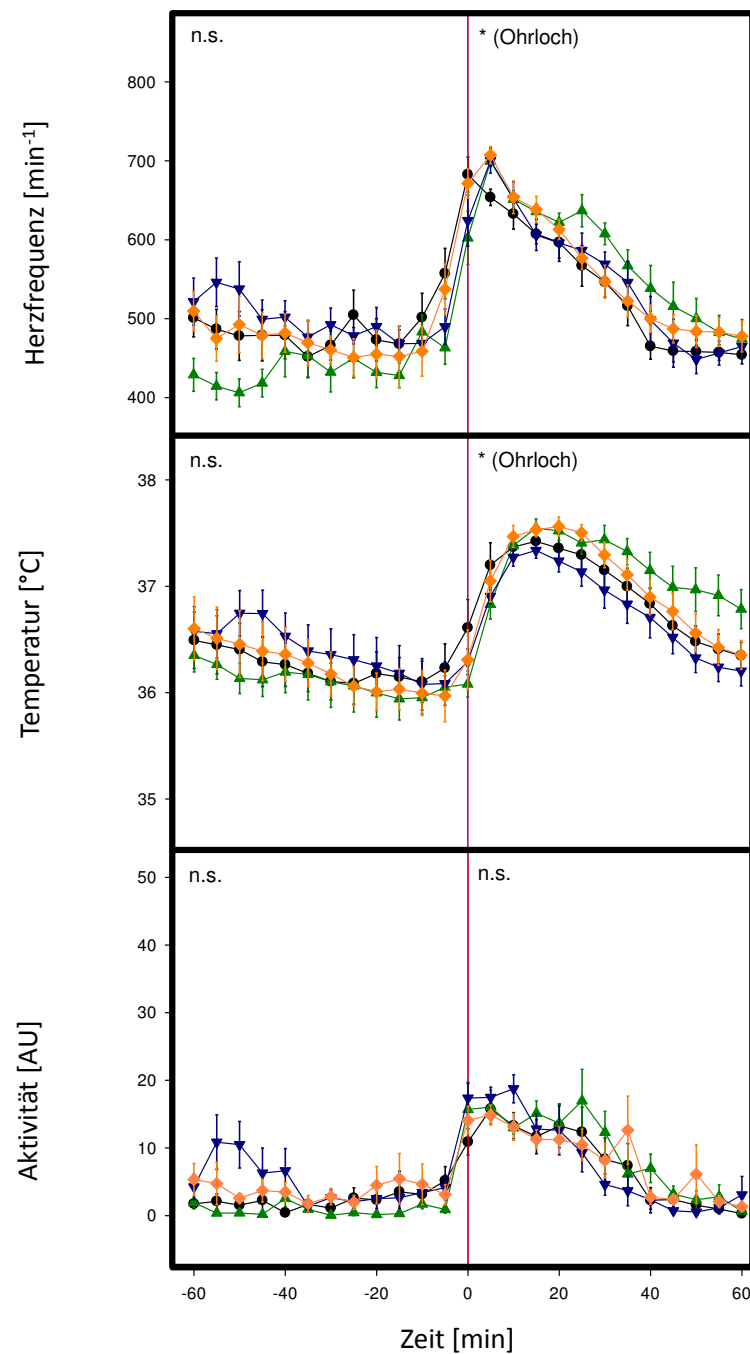
## Tag/Nacht-Rhythmus des Tragens (Ohrmarkierung)

Um zu untersuchen, ob die Kennzeichnung durch Ohrlochung, Ohrmarke oder RapID eventuell langfristige Auswirkungen auf die Versuchstiere hat, wurden Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität über vier Wochen aufgezeichnet und für die

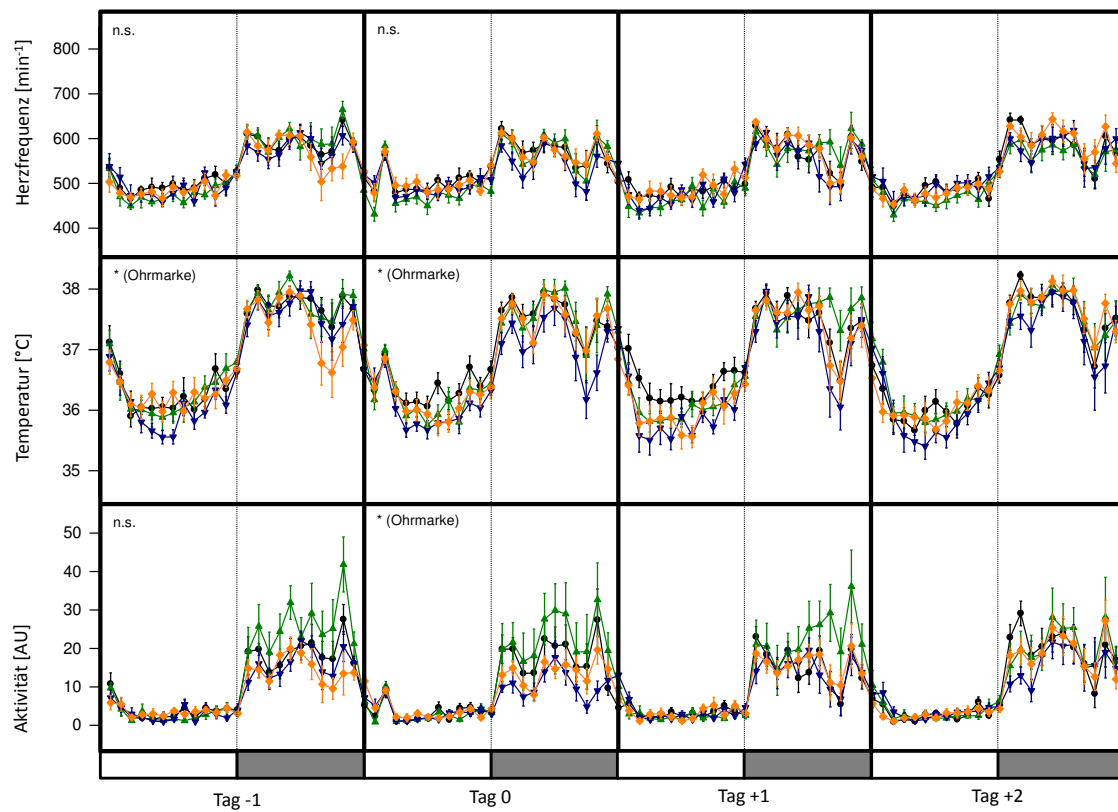
Tage 5/6, 12/13, 19/20 und 26/27 abgebildet (Abbildung 4.27). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass keine der Versuchsgruppen ein signifikantes Abweichen der telemetrisch erfassten Parameter von den Kontrollen zeigt oder Veränderungen im regelmäßigen Tag/Nacht-Rhythmus entwickelt.



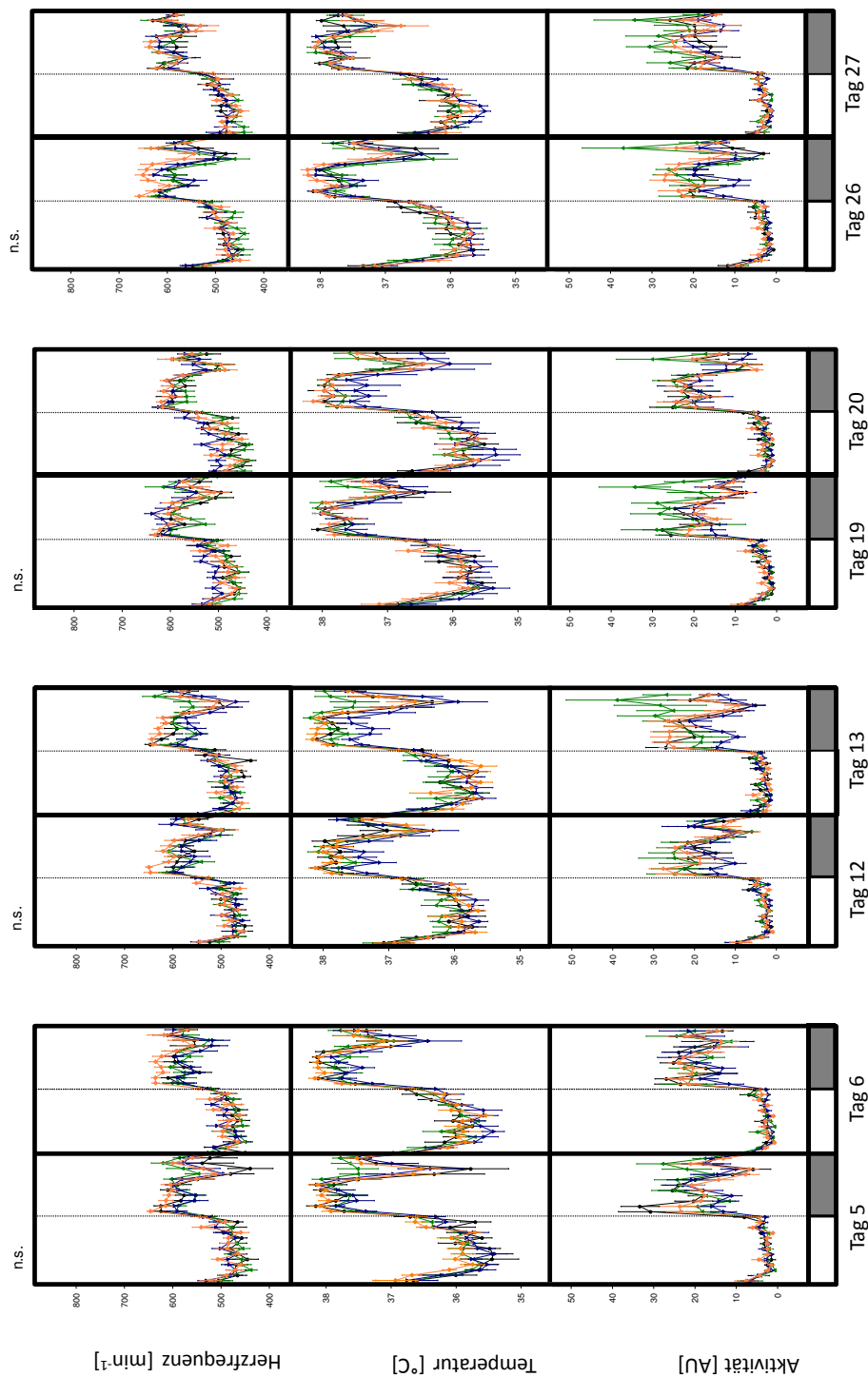
**Abbildung 4.24 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während des Ablesens von Ohrloch, Ohrmarke und RapID sowie der Kontrolle bei C57BL/6 (n=8, grün=Ohrloch, blau=Ohrmarke, gelb=RapID, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die rote Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.



**Abbildung 4.25 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während des Ablesens von Ohrloch, Ohrmarke und RapID sowie der Kontrolle bei C57BL/6 (n=8, grün=Ohrloch, blau=Ohrmarke, gelb=RapID, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die rote Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.



**Abbildung 4.26 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag des Ablesens (Tag 0) von Ohrloch, Ohrmarke und RapID sowie der Kontrolle bei C57BL/6 (n=8, grün=Ohrloch, blau=Ohrmarke, gelb=RapID, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abbildung 4.27 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während des Tragens von Ohrloch, Ohrmarke und RapID sowie der Kontrolle an acht Tagen bei C57BL/6 (n=8, grün=Ohrloch, blau=Ohrmarke, gelb=RapID, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.



## 4.2.2 Kennzeichnung mittels p-Chip

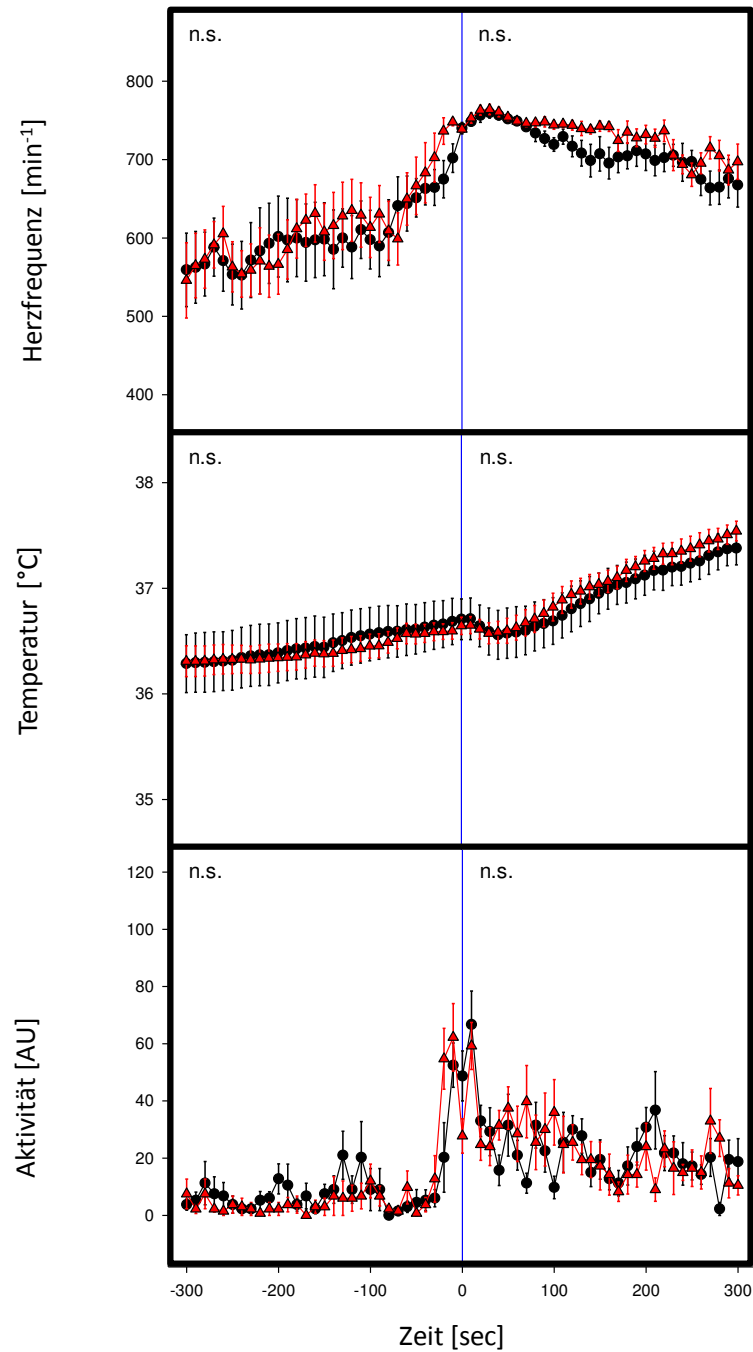
### Setzen des p-Chip

Die Kontrolltiere wurden aus dem Käfig genommen und am Schwanz in der vom p-Chip Hersteller empfohlenen Vorrichtung fixiert. Den Versuchstieren wurde zusätzlich der p-Chip injiziert (siehe hierzu auch Abschnitt 3.3.2).

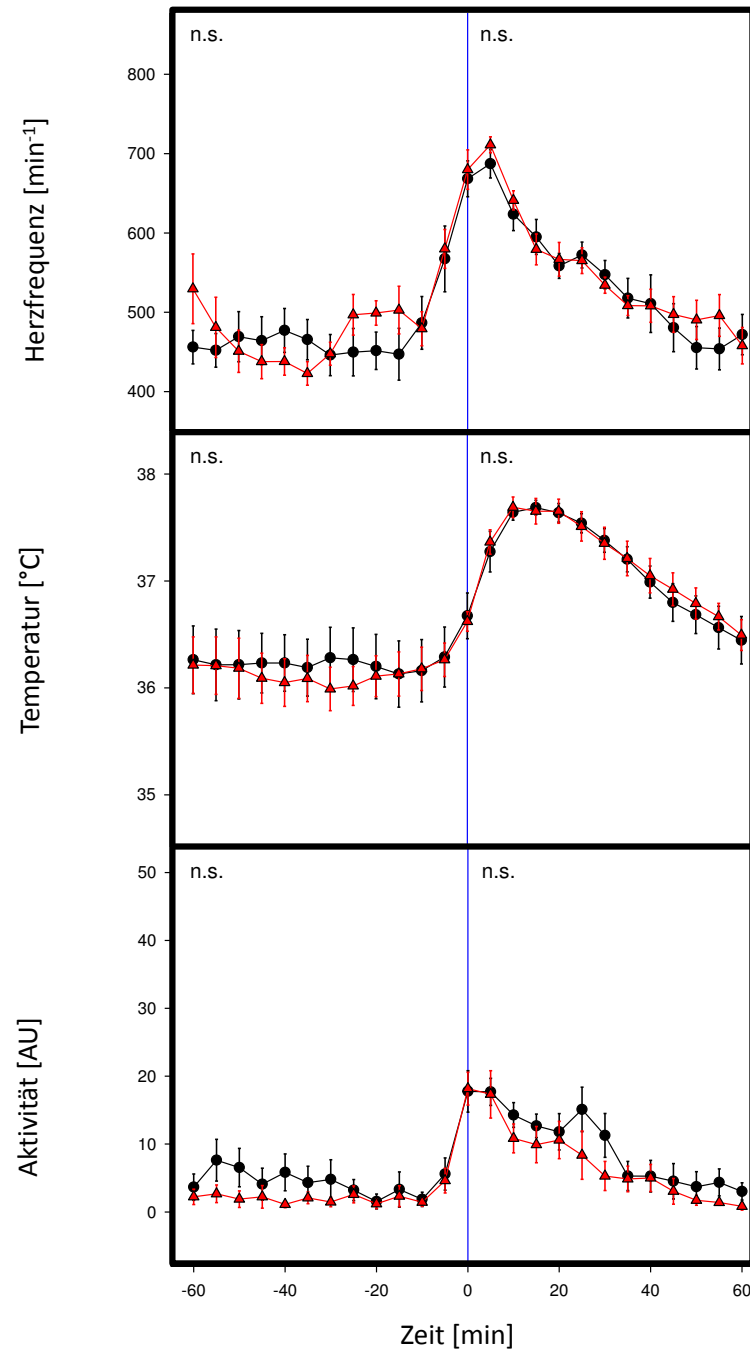
Die Reaktion der Kontrolltiere in der *Akuten Phase* unterscheidet sich für alle 3 gemessenen Parameter nicht wesentlich von den Reaktionen im Rahmen der Ohrmarkierungen oder Blutentnahmen in dieser Phase (Abbildung 4.28). Die Kontrollgruppe bildet jedoch nur ein kurzzeitiges Plateau mit hohen Herzfrequenzen und niedrigem Standardfehler aus. Signifikante Unterschiede hierzu können in der mittels p-Chip gekennzeichneten Gruppe nicht festgestellt werden. Auffällig ist, dass es in keiner Gruppe zu einem Einknicken der Herzfrequenz am Nullzeitpunkt kommt. Zusammenfassend zeigt die statistische Untersuchung keine Unterschiede von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität vor oder nach dem Eingriff zwischen beiden Gruppen.

Die *Arousal Phase* zeigt die bekannte glockenförmige Verlaufsform aller drei Parameter für Kontroll- und Versuchsgruppe (Abbildung 4.29). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen können weder vor noch nach dem Eingriff für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität festgestellt werden.

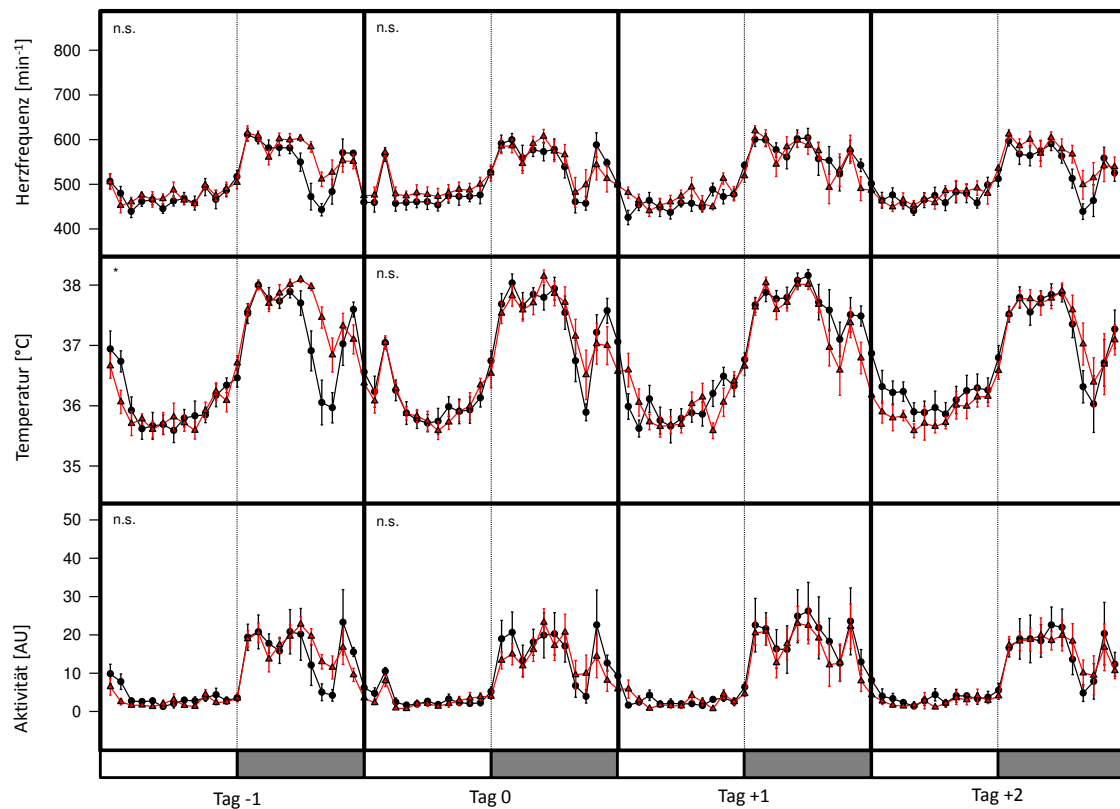
Auch der *Tag/Nacht-Rhythmus* von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität verläuft in charakteristischer Form wie bereits mehrfach für die C57BL/6 Mäuse beschrieben (Abbildung 4.30). Hier zeigen sich an Tag 0 keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Körpertemperatur, die sich an Tag -1 zeitraumspezifisch signifikant zwischen beiden Gruppen unterscheidet, weist an Tag 0 keine Unterschiede mehr auf.



**Abbildung 4.28 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Kennzeichnung mittels p-Chip bei C57BL/6 (n=8, rot=p-Chip, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.



**Abbildung 4.29 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während der Kennzeichnung mittels p-Chip bei C57BL/6 (n=8, rot=p-Chip, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.



**Abbildung 4.30 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag der Kennzeichnung (Tag 0) mittels p-Chip bei C57BL/6 (n=8, rot=p-Chip, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Lesen des p-Chip

Zum Ablesen des p-Chips wurden die Mäuse aus dem Käfig genommen, am Schwanz in der vom p-Chip Hersteller empfohlenen Vorrichtung fixiert und der Chip mittels Laser ausgelesen. Die Kontrolltiere wurden lediglich entsprechend fixiert (siehe hierzu auch Abschnitt 3.3.2).

Die Reaktion der Kontrollmäuse in der *Akute Phase* ist weniger deutlich als bei anderen Experimenten (siehe Abbildung 4.31). Die Herzfrequenz bei der Kontrollgruppe ist lediglich für ca. 40 Sekunden erhöht und beginnt dann bereits abzufallen. In der gekennzeichneten Gruppe steigt die Herzfrequenz bereits früher und für längere Zeit auf über 750 Herzschläge pro Minute an und beginnt erst nach ungefähr drei Minuten mit einem Absinken. In der Abbildung wird deutlich sichtbar, dass die Herzfrequenz bereits 30 Sekunden vor dem erfolgreichen Lesen ein Plateau erreicht hat.

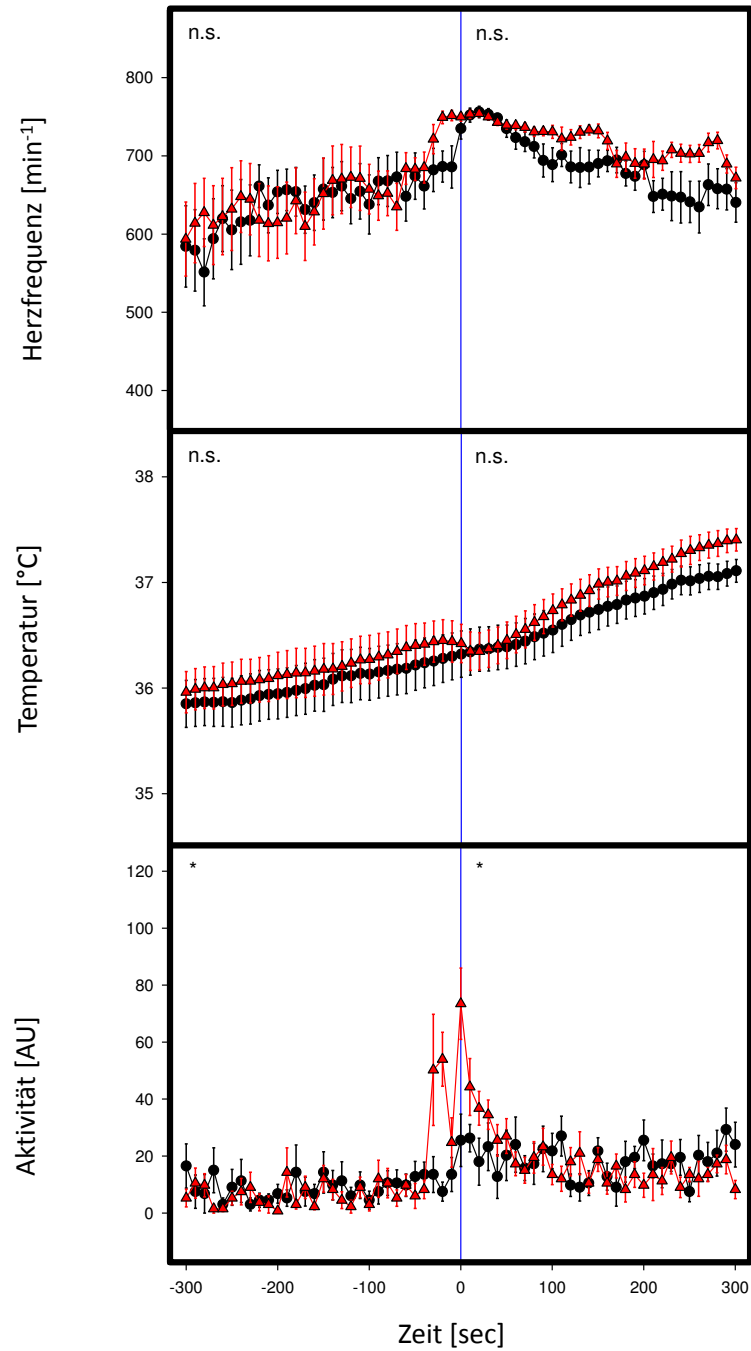
Bei Herzfrequenz und Körpertemperatur treten weder vor noch nach dem Eingriff signifikante Unterschiede zwischen den markierten Tieren und der Kontrolle auf. Zeitraumspezifisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen werden bezüglich der Aktivität in der Zeitphase vor und nach dem Ablesen festgestellt.

Auch die *Arousal Phase* beider Gruppen zeigt nur wenige Unterschiede zu den bisher beschriebenen Verlaufsformen (Abbildung 4.32). Statistisch signifikante Unterschiede bestehen in keinem Analysezeitraum.

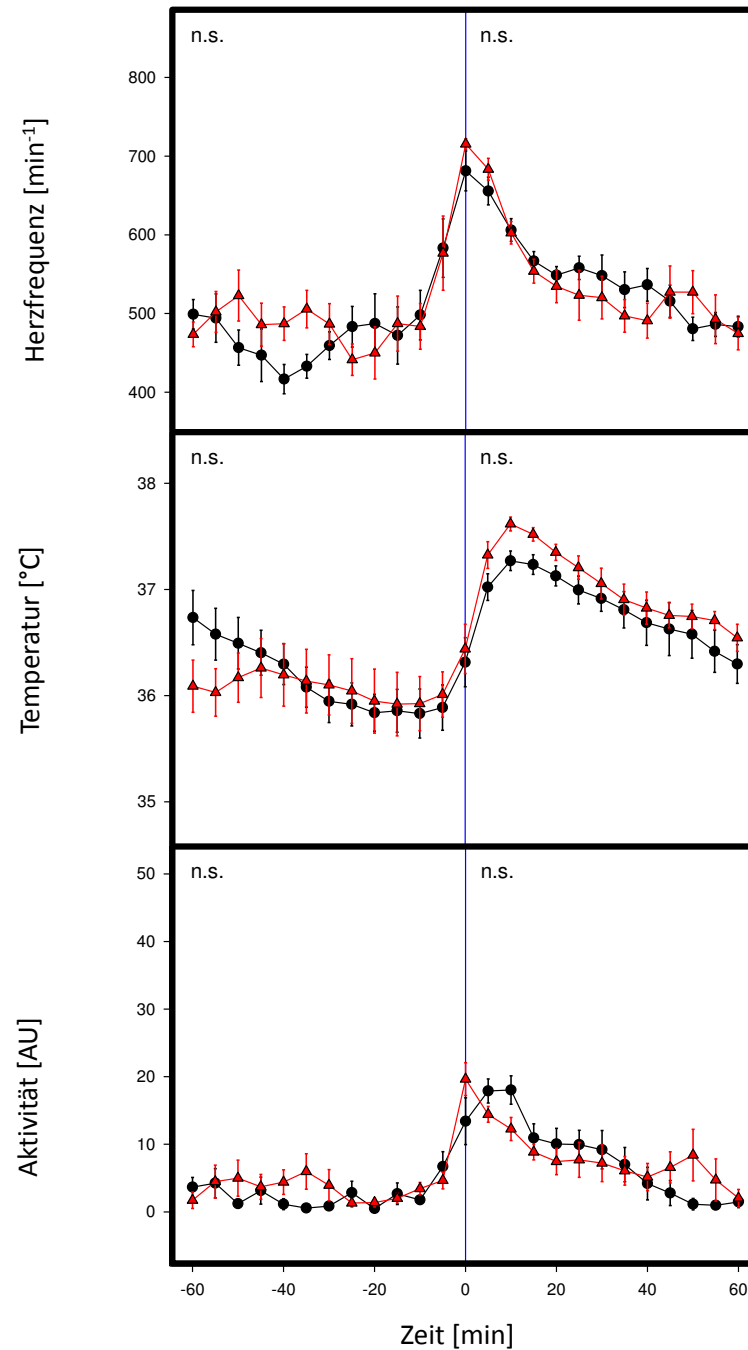
Der *Tag/Nacht-Rhythmus* aller drei Parameter der Versuchstiere verläuft ohne signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe und wie bereits mehrfach für B6 Mäuse beschrieben (Abbildung 4.33). Der Eingriff an Tag 0 ist in beiden Gruppen deutlich zu erkennen. Signifikante Unterschiede bestehen für keinen der Tage.

## Tag/Nacht-Rhythmus des Tragens (p-Chip)

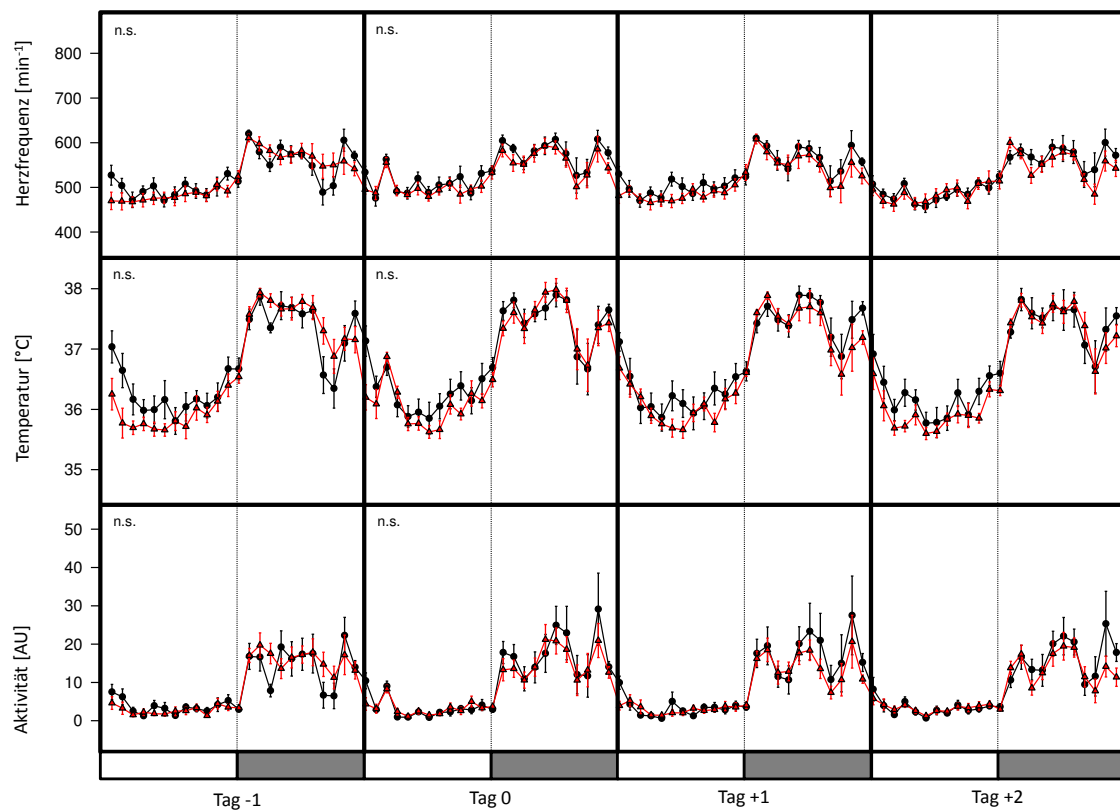
Auch nach einer Kennzeichnung mittels p-Chip wurde zur Analyse von Langzeiteffekten die Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität über vier Wochen aufgezeichnet und für die Tage 5/6, 12/13, 19/20 und 26/27 dargestellt (Abbildung 4.34). Der Kurvenverlauf von Kontroll- und Versuchsgruppe ist regelmäßig und entspricht dem typischen Muster. Die statistische Analyse der ausgewählten acht Tage zeigt keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität auf.



**Abbildung 4.31 :** *Akute Phase:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während des AbleSENS des p-Chip bei C57BL/6 (n=8, rot=p-Chip, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.

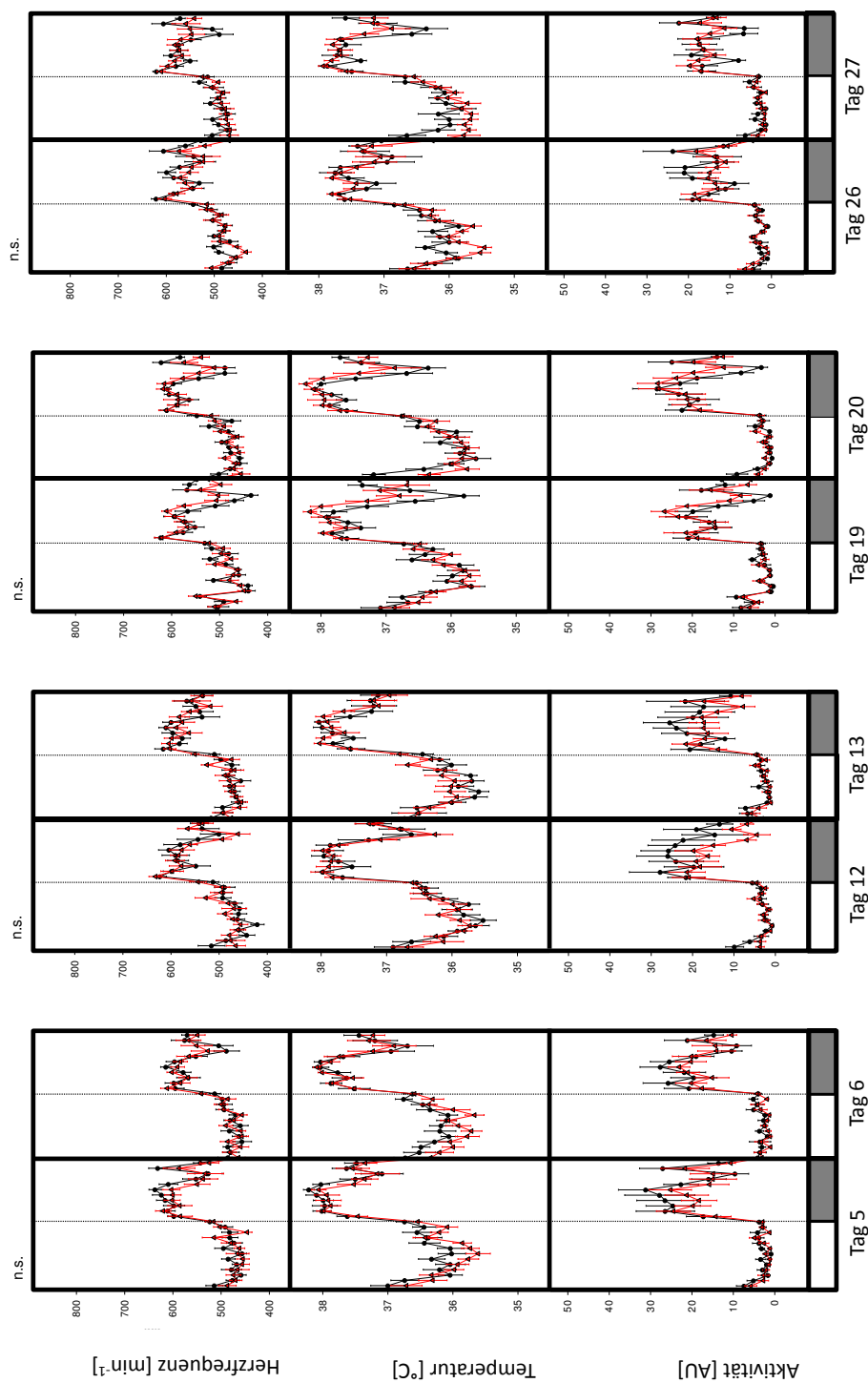


**Abbildung 4.32 :** *Arousal Phase*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während des Ablesens des p-Chip bei C57BL/6 (n=8, rot=p-Chip, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die blaue Nulllinie entspricht dem Zeitpunkt des Eingriffs.



**Abbildung 4.33 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität um den Tag des Ablesens (Tag 0) des p-Chip bei C57BL/6 (n=8, rot=p-Chip, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.





**Abbildung 4.34 :** *Tag/Nacht-Rhythmus*: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität während des Tragens des p-Chip sowie der Kontrolle an acht Tagen bei C57BL/6 (n=8, rot=p-Chip, schwarz=Kontrolle). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.2.3 Statistik

**Tabelle 4.2 :** Statistische Ergebnisse der Kennzeichnung ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ , n.s.=nicht signifikant,  $s^1$ =signifikanter Unterschied,  $s^2$ =zeitraumsspezifisch signifikanter Unterschied, \*=auch über 120 min signifikant; #=n.s. für die Tage +1/+2; prä/post= Zeitphase vor/nach dem Eingriff bzw. Tag -1/0)

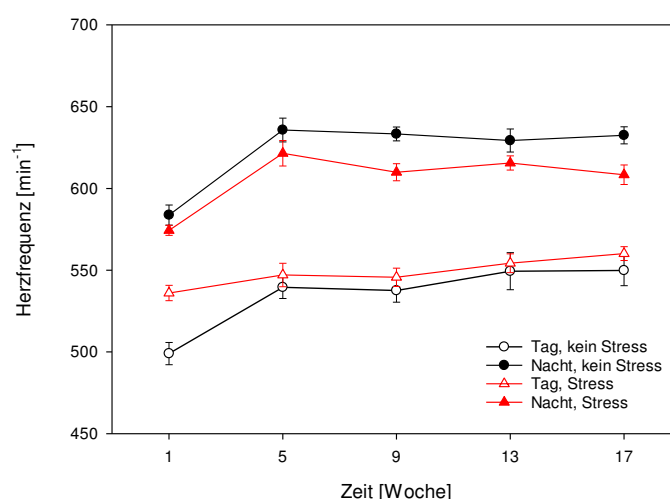
		Akute Phase					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Ohrloch	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	RapID	$s^2$	n.s.	$s^2$	$s^2$	n.s.	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		Arousal Phase					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
Setzen	Ohrloch	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$s^2$	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	$s^{1*}$	n.s.	$s^2$	n.s.	n.s.
	RapID	n.s.	$s^{1*}$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		Tag/Nacht-Rhythmus					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Ohrloch	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	$s^{2\#}$	n.s.	$s^{2\#}$	n.s.	$s^{2\#}$
	RapID	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	$s^2$	n.s.	n.s.	n.s.
		Akute Phase					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
	Ohrloch	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	$s^2$	n.s.	n.s.	$s^2$	n.s.
	RapID	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$s^2$	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$s^2$	$s^2$
		Arousal Phase					
		HF		Temp.		Akt.	
		<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>	<i>prä</i>	<i>post</i>
Lesen	Ohrloch	n.s.	$s^2$	n.s.	$s^2$	n.s.	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	RapID	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

		Tag/Nacht-Rhythmus					
		<b>HF</b>		<b>Temp.</b>		<b>Akt.</b>	
		<i>prü</i>	<i>post</i>	<i>prü</i>	<i>post</i>	<i>prü</i>	<i>post</i>
	Ohrloch	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	n.s.	s <sup>1</sup>	s <sup>1#</sup>	n.s.	s <sup>1#</sup>
	RapID	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		Tag 5/6			Tag 12/13		
		HF	Temp	Akt	HF	Temp	Akt
	Ohrloch	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	RapID	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tragen		Tag 19/20			Tag 26/27		
		HF	Temp	Akt	HF	Temp	Akt
	Ohrloch	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Ohrmarke	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	RapID	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-Chip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

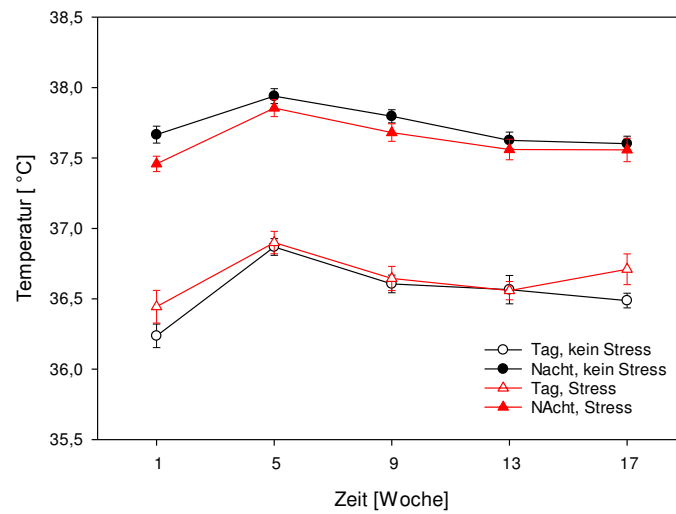
## 4.3 Chronisches Stressmodell

### 4.3.1 Übersichtsdarstellung des Tag/Nacht-Rhythmus

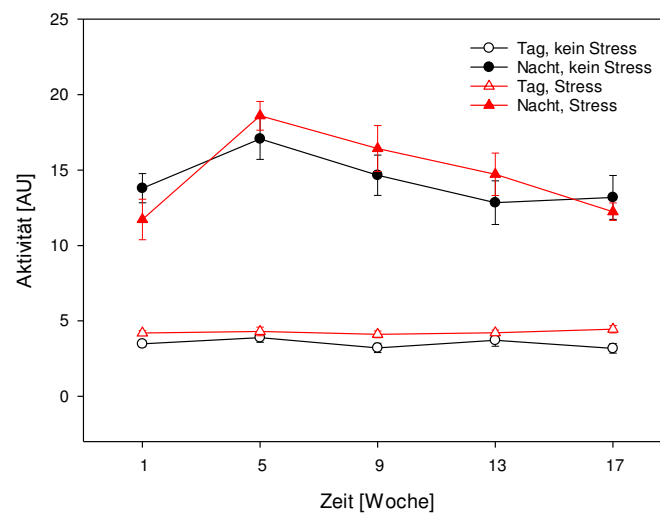
Die Abbildungen 4.35, 4.36 und 4.37 geben einen Überblick über alle Messwochen. Hierzu wurden alle Daten der Helligkeitsperiode sowie alle Daten der Dunkelperiode von einer gesamten telemetrisch erfassten Woche zusammen gefasst. Sämtliche Rohdaten (alle 10 sec) einer Woche werden so auf jeweils einen Wert für die Helligkeits- und einen Wert für die Dunkelperiode reduziert. Trends zwischen den einzelnen gemessenen Wochen können hierdurch zusammenfassend dargestellt und statistisch getestet werden. Es zeigt sich, dass die Verabreichung einer Western Diät mit Beginn der Versuchswoche 5 bereits ohne Unterteilung in Stress- und Kontrollgruppe zu einer signifikanten ( $p < 0,001$ ) Erhöhung der Herzfrequenz-, der Körpertemperatur- und der Aktivitätswerte in der Dunkelperiode (Aktivitätsphase) führt. Dieser Effekt kann für die Herzfrequenz und die Körpertemperatur auch in der Helligkeitsphase (Inaktivitätsphase) nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Die gestressten Mäuse zeigen in der Aktivitätsperiode eine anhaltende, signifikante Herzfrequenzminderung gegenüber der Kontrollgruppe über die komplette Beobachtungsdauer ( $p < 0,05$ ). Dieser Effekt geht mit signifikanten aber zeitraumspezifischen Aktivitätsveränderungen einher. In der Helligkeitsperiode waren die Aktivitätswerte der gestressten Tiere ständig ( $p < 0,05$ ) und die Herzfrequenzwerte in zeitraumspezifischer Weise signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht.



**Abbildung 4.35 :** Darstellung der Herzfrequenz über die komplette Versuchsdauer, zusammengefasst für die Helligkeits- und Dunkelperiode. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Übersicht in Tabelle 4.3.



**Abbildung 4.36 :** Darstellung der Körpertemperatur über die komplette Versuchsdauer, zusammengefasst für die Helligkeits- und Dunkelperiode. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Übersicht in Tabelle 4.3.

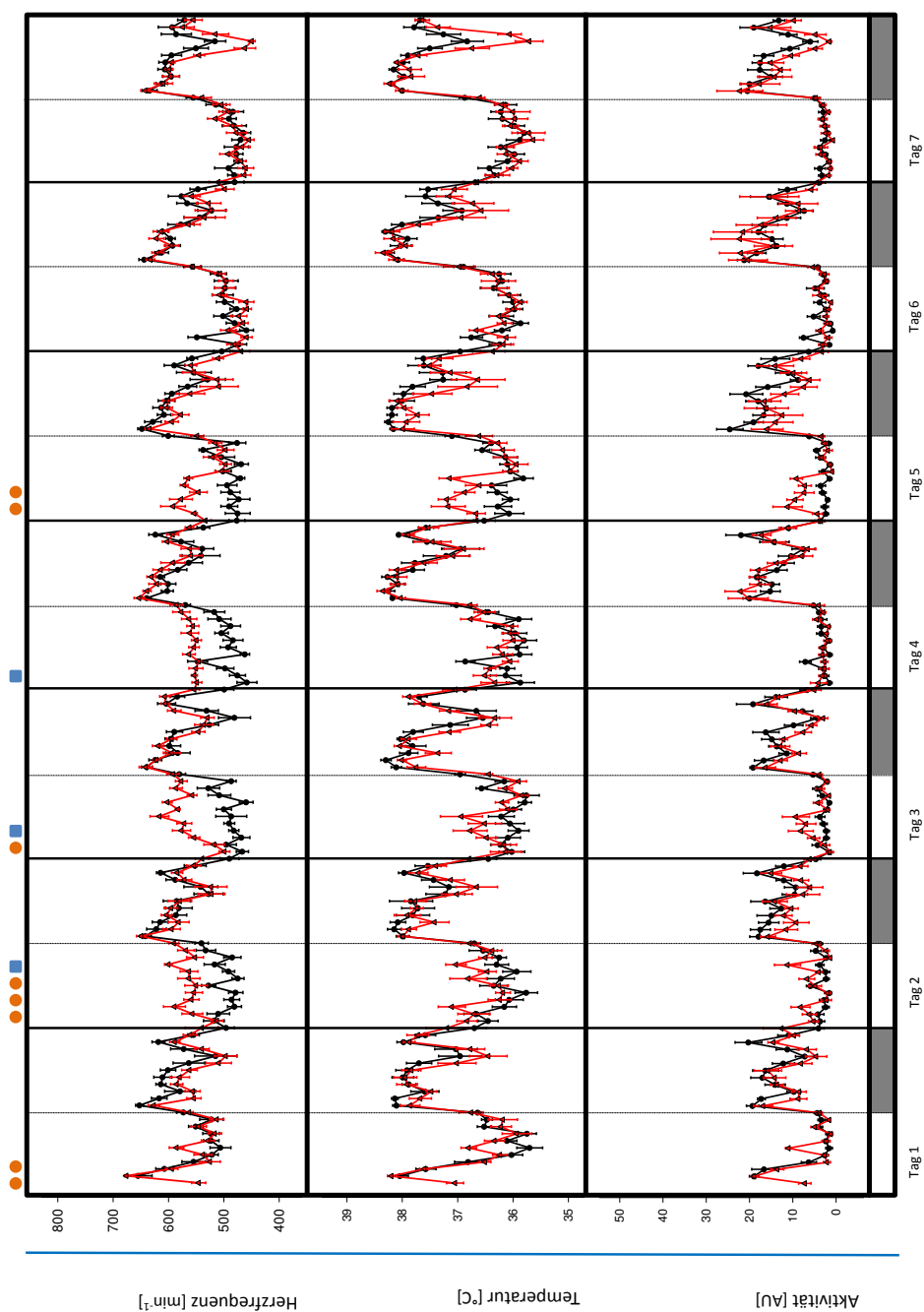


**Abbildung 4.37 :** Darstellung der Aktivität über die komplette Versuchsdauer, zusammengefasst für die Helligkeits- und Dunkelperiode. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Übersicht in Tabelle 4.3.

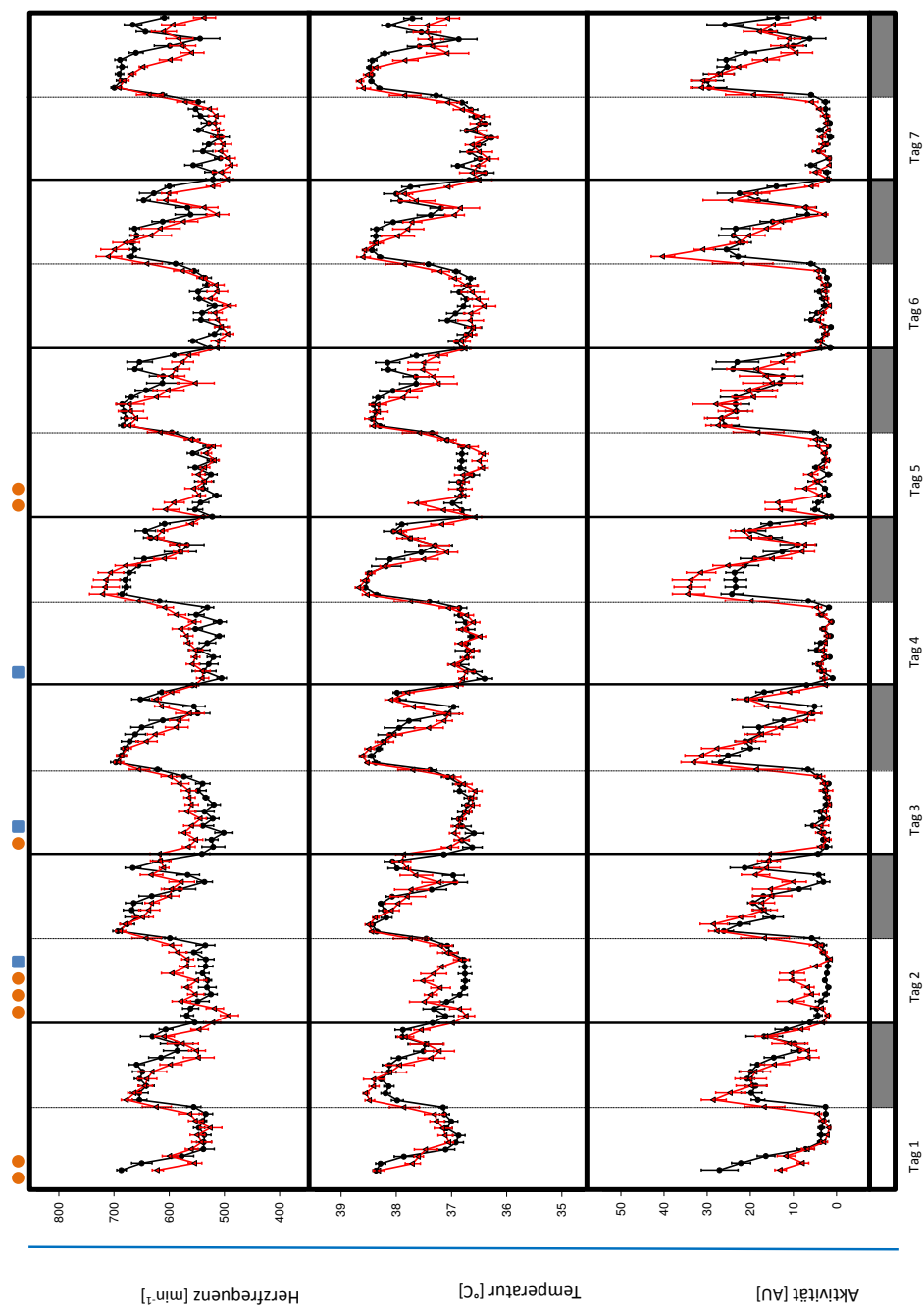
### 4.3.2 Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus

Betrachtet man die Abbildung der ersten Versuchswoche sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen den gestressten und den ungestressten Tieren (Abbildung 4.38). Man erkennt, dass die gestressten Tiere an Tag 2, 3, 4, und 5 eine höhere Herzfrequenz in der Inaktivitätsperiode zeigen als die Kontrolltiere. Dies beinhaltet sowohl die Tage mit Käfigwechsel als auch die Tage mit Einzelhaltung, die einen offensichtlich erhöhten kardiovaskulären Erregungszustand hervorrufen (vgl. Tabelle 3.8 zur Verteilung der Stressoren). Interessanterweise zeigen sich in der Aktivitätsphase an diesen Tagen aber keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden Gruppen. An den Tagen 6 und 7 (ohne Stressreiz) ist die Herzfrequenz in der Inaktivitätsphase zwischen Stressgruppe und Kontrolle vergleichbar, in der Aktivitätsphase fällt aber an Tag 7 auf, dass die Tiere, die im Verlauf der Woche gestresst wurden, in der Nacht zeitweise eine reduzierte Herzfrequenz zeigen. Offensichtlich kommt es nach der Stresseinwirkung zu vermehrten Ruhepausen in ihrer Aktivitätsperiode. Diese Tendenzen spiegeln sich auch in der Körpertemperatur und der Aktivität wieder, erreichen aber nicht das Ausmaß wie bei der Herzfrequenz.

In den nachfolgenden Versuchswochen entwickeln sich leicht veränderte Kurven was besonders in Versuchswoche 17 deutlich wird (Abbildung 4.42, letzte telemetrisch gemessene Woche). Es fällt auf, dass der Herzfrequenzunterschied zwischen den gestressten und ungestressten Tieren an den Tagen 2, 3, 4 und 5 geringer wird. Eine deutlich erhöhte Herzfrequenz der gestressten Tiere über einen längeren Zeitraum in der Inaktivitätsperiode ist nur an Tag 2 und 3 feststellbar. Wie in Versuchswoche 1 auch sind an diesen Tagen keine Unterschiede in der Dunkelperiode festzustellen. An Tag 4 (Donnerstag) wurden die Mäuse einzeln gehalten, ein Umstand der in Versuchswoche 1 noch zu einer erhöhten Herzfrequenz führt, in Versuchswoche 17 aber keine relevanten Unterschiede mehr zwischen beiden Gruppen hervorruft. Die vermehrten Ruhephasen der gestressten Tiere in der Dunkelperiode (mit besonders reduzierter Herzfrequenz) sind in den späteren Wochen deutlicher und beginnen in Versuchswoche 17 beispielsweise schon ab Wochentag 5.

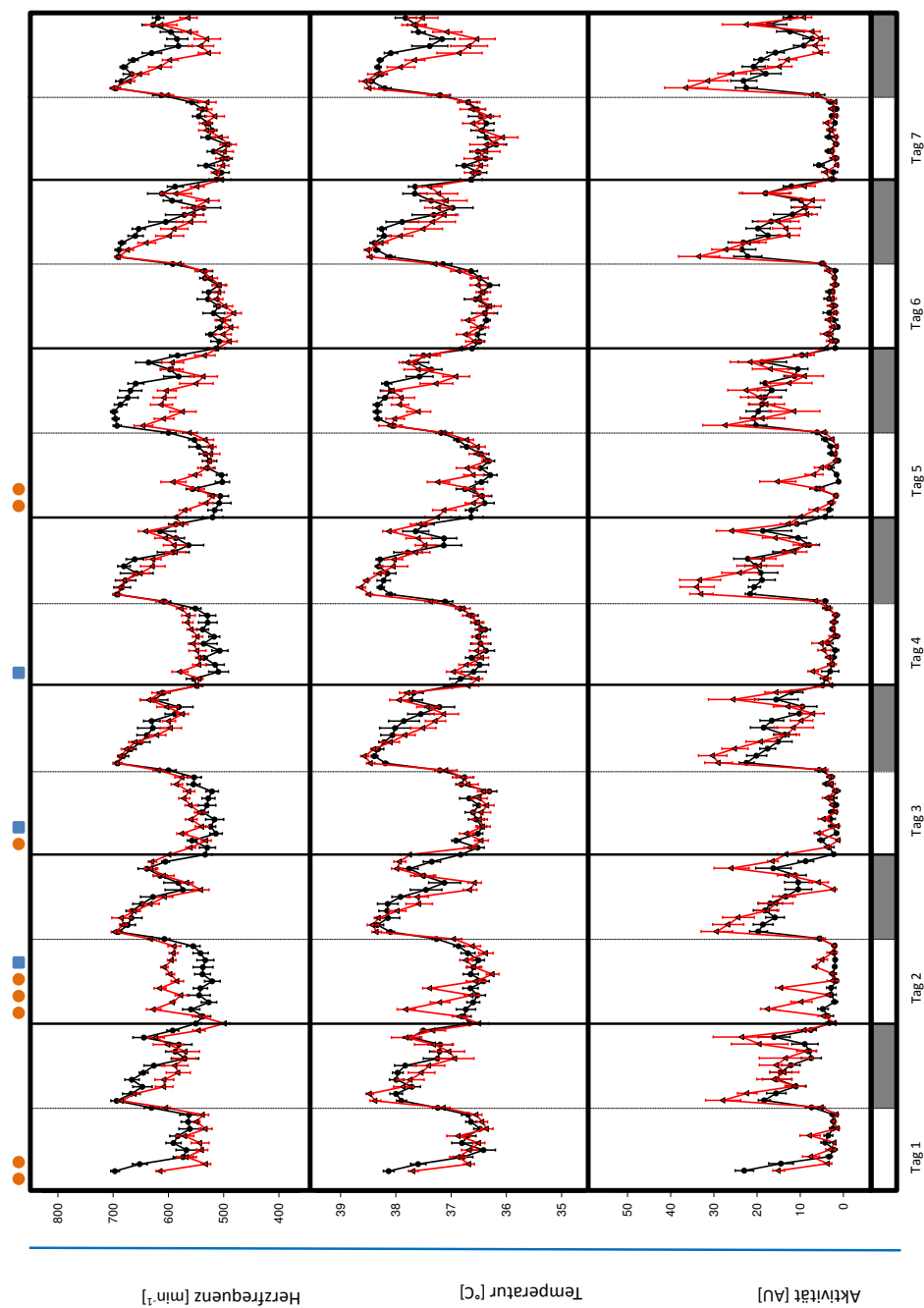


**Abbildung 4.38 :** *Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität der gestressten (rot) und ungestressten (schwarz) Mäuse in der 1. Versuchswoche (jeweils  $n=8$ ); graue Balken zeigen die Dunkelperiode, orangefarbene Kreise zeigen einen Käfigwechsel an, blaue Quadrate markieren Tage mit Einzelhaltung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

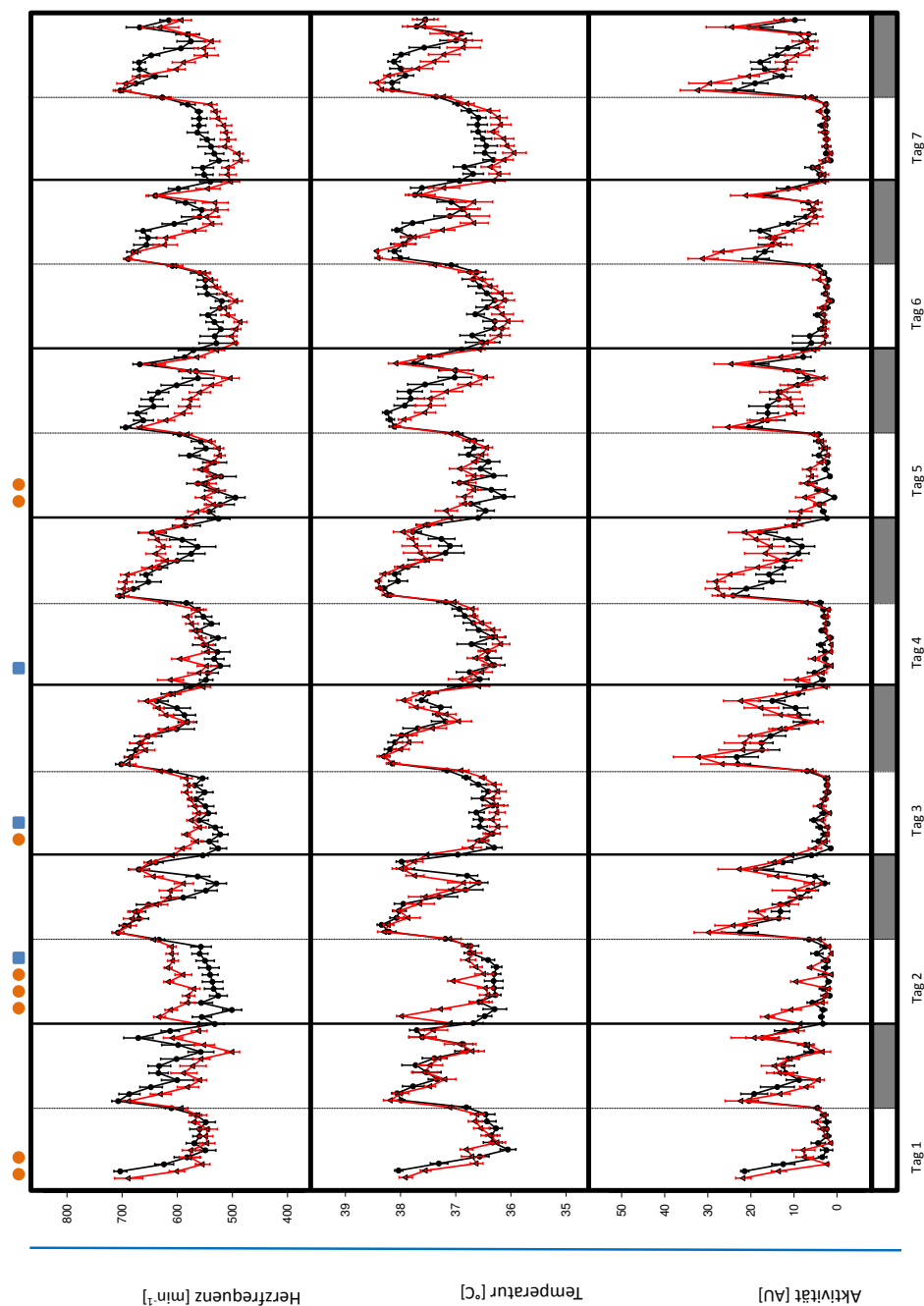


**Abbildung 4.39 :** *Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität der gestressten (rot) und ungestressten (schwarz) Mäuse in der 5. Versuchswoche (jeweils  $n=8$ ); graue Balken zeigen die Dunkelperiode, orangefarbene Kreise zeigen einen Käfigwechsel an, blaue Quadrate markieren Tage mit Einzelhaltung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

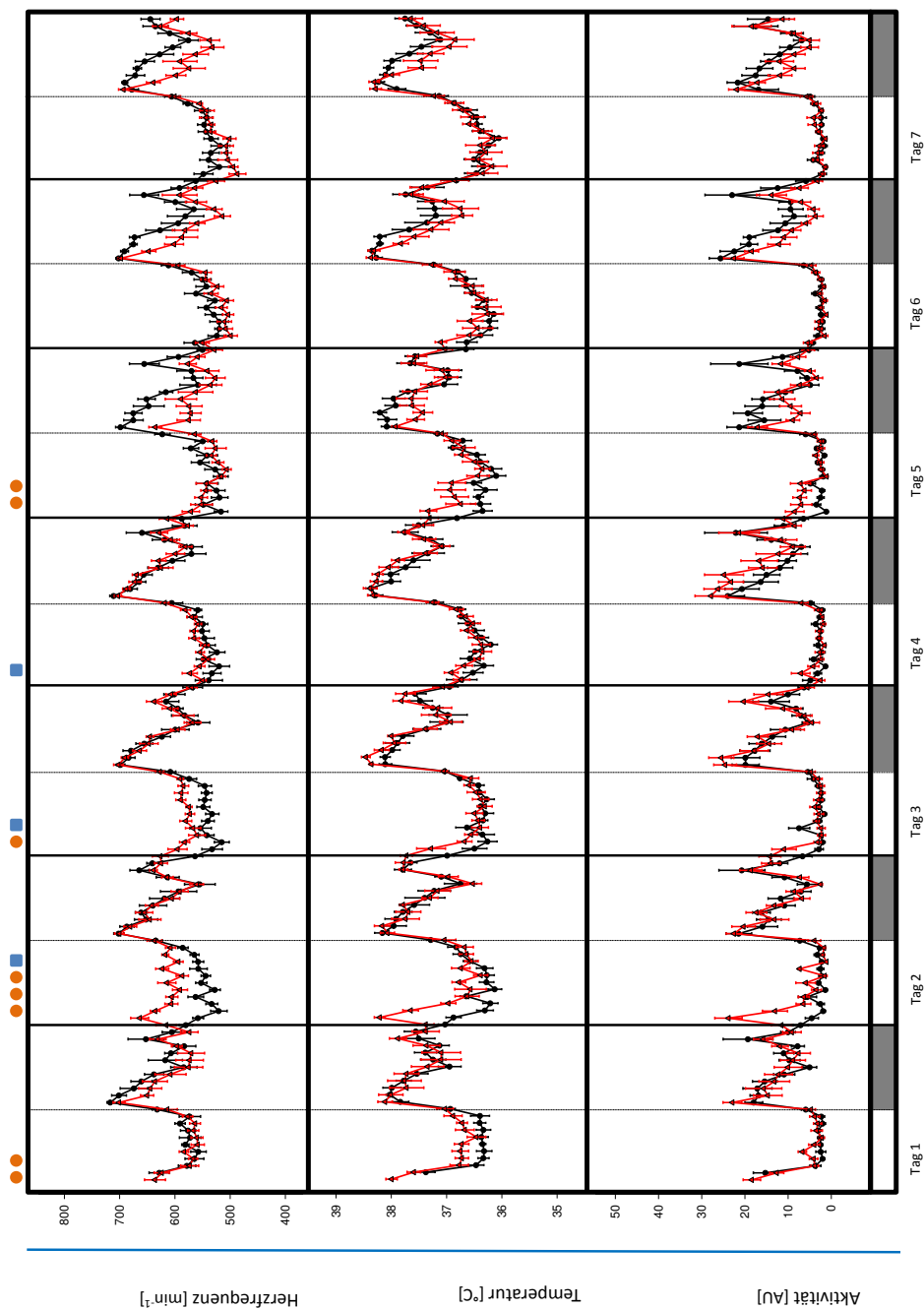




**Abbildung 4.40 :** *Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität der gestressten (rot) und ungestressten (schwarz) Mäuse in der 9. Versuchswoche (jeweils  $n=8$ ); graue Balken zeigen die Dunkelperiode, orangefarbene Kreise zeigen einen Käfigwechsel an, blaue Quadrate markieren Tage mit Einzelhaltung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.



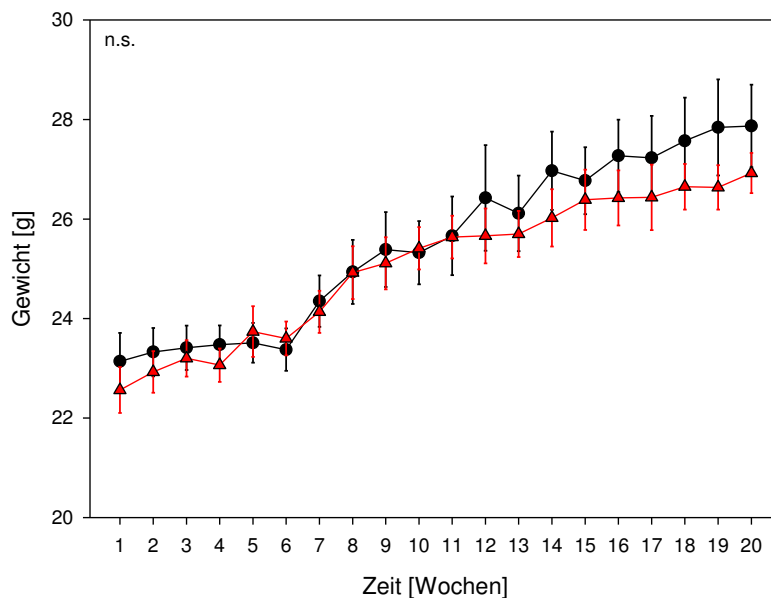
**Abbildung 4.41 :** *Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus: telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität der gestressten (rot) und ungestressten (schwarz) Mäuse in der 13. Versuchswoche (Stressgruppe n=8, Kontrolle n=7); graue Balken zeigen die Dunkelperiode, orangefarbene Kreise zeigen einen Käfigwechsel an, blaue Quadrate markieren Tage mit Einzelwerten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.*



**Abbildung 4.42 :** *Wochenweise Darstellung des Tag/Nacht-Rhythmus:* telemetrisch gemessene Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität der gestressten (rot) und ungestressten (schwarz) Mäuse in der 17. Versuchswoche (Stressgruppe  $n=8$ , Kontrolle  $n=7$ ); graue Balken zeigen die Dunkelperiode, orangefarbene Kreise zeigen einen Käfigwechsel an, blaue Quadrate markieren Tage mit Einzelhaltung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.3.3 Körpergewicht

Die Abbildung (4.43) zeigt, dass das Körpergewicht der  $Apoe^{-/-}$  Kontrollmäuse als auch der gestressten  $Apoe^{-/-}$  Tiere über die komplette Zeit des Versuchs zunimmt. Im Verlauf der 20 Versuchswochen steigt das Gewicht der ungestressten Mäuse im Durchschnitt um 4,7 g und das der gestressten Mäuse um 4,4 g. Ein abweichender Trend der Körpergewichtsentwicklung zwischen beiden Gruppen ist zu erkennen, hierbei handelt es sich aber um keinen statistisch signifikanten Effekt. Das mittlere Körpergewicht beider Gruppe zeigt zwischen Versuchswoche 5 und 6 eine geringe Abnahme (-0,1375 g in beiden Gruppen). Dies könnte mit der Futterumstellung auf Western Diät mit Beginn der 5. Woche in Zusammenhang stehen.



**Abbildung 4.43 :** Körpergewichtsentwicklung der gestressten (rot) und ungestressten Tiere (schwarz); (n=8; ab Versuchswoche 15 n=7 in der Kontrollgruppe); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.3.4 Statistik

**Tabelle 4.3 :** Statistische Ergebnisse der Übersichtsdarstellung des Tag/Nacht-Rhythmus, Abbildungen 4.35, 4.36 und 4.37 ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ; ab Versuchswoche 15  $n=7$  in der Kontrollgruppe; n.s.=nicht signifikant, s=signifikanter Unterschied)

		HF	Temp.	Akt.
Helligkeitsperiode	Stress	n.s.	n.s.	s
	Zeit	s	s	n.s.
	Stress*Zeit	s	n.s.	n.s.
Dunkelperiode	Stress	s	n.s.	n.s.
	Zeit	s	s	s
	Stress*Zeit	n.s.	n.s.	s

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie ist es Belastungen, wie sie durch verschiedene Formen der Blutentnahme und der Kennzeichnung sowie durch chronischen Stress entstehen, telemetrisch zu erfassen und zu beurteilen.

## 5.1 Diskussion der Methode

### 5.1.1 Tierausswahl

Mäuse werden auf Grund ihrer geringen Größe, ihrer kurzen Generationsfolge und ihrer phylogenetischen Nähe zum Menschen häufig für Tierversuche eingesetzt [Europäische Kommission, 2013, Hedrich, 2012]. Die Möglichkeit das Genom der Maus in effizienter Weise zu verändern hat das Interesse an dieser Versuchstierspezies zusätzlich befördert. Gleichzeitig bestehen Schwierigkeiten, das Wohlbefinden von Mäusen anhand klinischer Untersuchungen abzuschätzen. Im Rahmen dieser Arbeit soll für eine Reihe von Routineeingriffen eine Belastungseinschätzung für das Versuchstier Maus durchgeführt werden.

Die Tiergruppen der einzelnen Teilversuche wurden sehr homogen gewählt. Sämtliche Mäuse, die im Rahmen einer Fragestellung untersucht wurden, hatten den gleichen genetischen Hintergrund und das gleiche Geschlecht sowie ähnliches Körpergewicht und Alter. Grundsätzlich sollten Mäuse als soziale Tierart paarweise oder in Gruppen gehalten werden [GV-SOLAS, 2007]. Eine Einzelhaltung kann per se schon die physiologischen Parameter der Maus zu beeinflussen. So beobachteten Späni et al. mittels Telemetrie Abweichungen von Herzfrequenz und Körpertemperatur bei Mäusen in Einzelhaltung verglichen mit Mäusen in Gruppenhaltung [Späni et al., 2003]. Harmonische und stabile Gruppen erhält man bei adulten Mausböcken am ehesten mit Wurfgeschwistern [GV-SOLAS, 2007]. Da dies in der vorliegenden Studie nicht realisierbar war, eine Paarhaltung aber andererseits gewünscht war, wurden für sämtliche Fragestellungen weibliche Mäuse eingesetzt. Alle beschriebenen Ergebnisse sollten vor einer Verallgemeinerung also zumindest stichprobenartig mit männlichen Tieren überprüft werden. Durch die Verwendung des gleichen Mausstammes (C57BL/6J) zur Belastungseinschätzung von Einzeleingriffen (Blutentnahme und Kennzeichnung) kann die Stressantwort dieses Stammes übergreifend verglichen werden. Um den Einfluss der Genetik auf die Reaktionen abzuschätzen wurde ein weiterer Inzuchtstamm (BALB/c) verwendet. Die  $Apoe^{-/-}$  Mäuse, die für die Versuche zum chronischen Stress eingesetzt wurden, besitzen zwar einen B6 Hintergrund, ihre genetische Veränderung lässt jedoch nicht zwangsläufig eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf B6 Mäuse zu.

### 5.1.2 Telemetrie

Die Telemetrie ist eine geeignete Methode um von nicht fixierten Tieren, die sich in ihrer gewohnten Umgebung befinden, über eine längere Zeit Daten zu erheben ohne dass die Daten durch die Anwesenheit von Experimentatoren im Raum beeinflusst werden. Dies bringt einen großen Vorteil in der Belastungsforschung im Unterschied zu konventionellen Methoden mit sich. Die in dieser Arbeit verwendeten Transmitter besitzen ein Gewicht von 1,6 g und damit 6,4 % des Körpergewichts einer durchschnittlich schweren B6 Maus (25 g). Mit einem Volumen von 1,1  $\text{cm}^3$  nehmen sie einen nennenswerten Platz in der Bauchhöhle ein. Dies wirft die Frage auf, ob schon das Tragen per se eine Belastung für die Mäuse darstellt. Drei Arbeitsgruppen konnten dies aber unabhängig voneinander mit zum Teil größeren Transmittern widerlegen und innerhalb kurzer Zeit eine Erholung von der Implantation feststellen [Leon et al., 2004, Baumans et al., 2001, Mills et al., 2000]. Hierbei verwendeten sie Transmitter, deren Gewicht bis zu ca. 12 % des Körpergewichts betrug [Baumans et al., 2001]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde allen Mäusen eine vierwöchige Rekonvaleszenzzeit nach Einsetzen des Transmitters gegeben. Mögliche Beeinflussungen der Maus und damit der Messungen durch den Transmitter lassen sich nie vollständig ausschließen, werden im Rahmen dieser Arbeit aber als unwahrscheinlich beurteilt. Zudem würde sich ein solcher systematischer Fehler durch den Transmittereinfluss sowohl auf die Versuchsgruppe als auch auf die Kontrollgruppe gleichermaßen auswirken. Vergleiche zwischen beiden Gruppen sind damit ebenso möglich wie Vergleiche zwischen verschiedenen Messzeiträumen.

Die akute kardiale Reaktion von B6 Mäusen auf eine bloße Fixierung ist sehr gleichförmig und durch eine maximale Herzfrequenz mit geringen interindividuellen Schwankungen gekennzeichnet. Während dieser kardiovaskulären Extremsituation kann die Herzfrequenz möglicherweise nicht mehr anzeigen, ob der Eingriff selbst zu einer zusätzlichen Belastung, die über den Stress der Fixierung hinaus geht, führt. Es ist jedoch zu erwarten, dass sich ein Effekt durch den Eingriff auch über den longitudinalen zeitlichen Verlauf der Messwerte zeigt, indem also beispielsweise die Herzfrequenz der Versuchstiere über einen längeren Zeitraum erhöht bleibt, während die Kontrollgruppe sich eher erholt. Außerdem ist unklar ob die gemessenen Extrema der Herzfrequenz (z.B. 750 Herzschläge pro Minute nach Blutentnahme aus der Vena saphena) die tatsächliche Obergrenze dieses Stammes darstellen oder ob ein noch extremerer Reiz zu noch höheren Werten führen könnte. In Erhardt, 2012 wurden beispielsweise Höchstwerte für die Herzfrequenz von bis zu 840 Schlägen/Minute beschrieben [Erhardt et al., 2012]. Insbesondere die BALB/c Mäuse reagieren weniger markant auf den Eingriff, sodass bei Tieren dieses Stammes ein weiteres Ansteigen der Herzfrequenz möglich wäre.



### 5.1.3 Versuchsaufbau: Methoden der Blutentnahme

Um ein standardisiertes Vorgehen zu gewährleisten, wurden alle Blutentnahmen (im Bezug auf Kanüldurchmesser oder Punktionsstelle) in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der GV-SOLAS durchgeführt [GV-SOLAS, 2009]. Mit den verschiedenen Entnahmemethoden kann unterschiedlich schnell eine mehr oder weniger große Menge Blut gewonnen werden. Es wurde darauf geachtet, unmittelbar nach Austritt des Blutes die Blutentnahme zu beenden, sodass keine Belastung durch Hypovolämie entsteht. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Reaktion der Mäuse könnte der Entnahmezeitpunkt sein und der damit zusammenhängende Aktivitätszustand. In Anlehnung an reguläre Arbeitszeiten und Laborroutine sowie zur besseren Vergleichbarkeit untereinander wurden sämtliche Eingriffe zwischen 9:00 und 10:00 Uhr durchgeführt. Der gewählte Zeitpunkt fällt somit in die Inaktivitätsphase der Mäuse.

Zur Blutentnahme an der Vena saphena musste die entsprechende Stelle rasiert werden. Diese Vorbereitung wurde bewusst vorverlegt und nicht zum Zeitpunkt der Blutentnahme durchgeführt. Die verlängerte Fixierungszeit und die Geräuschbelastung durch die Schermaschine sind weitere Stressoren, die eine Vergleichbarkeit mit den anderen Formen der Blutentnahme erschweren würden. Ähnliches gilt für die Blutentnahme aus der Schwanzvene, wo auf eine Erwärmung der Tiere zur leichteren Punktion und Gewinnung größerer Blutmengen verzichtet wurde. Auch wenn die Durchführung damit nicht exakt der Praxis entspricht, wurde hier der Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Methoden der Blutentnahme Vorrang gegeben. Gerade die längere Fixierung und die Erwärmung des Tieres hätten einen deutlich messbaren Unterschied zu anderen Methoden ausgelöst und würden einer Beurteilung der Stressbelastung durch die Blutentnahme selbst im Wege stehen.

Auch wenn die Telemetrieanlage eine größere Anzahl an Tieren parallel messen kann, wurden die Blutentnahmen bzw. Kontrollen nur an maximal 8 Tieren pro Raum und Termin durchgeführt. Der Hintergrund für diese Einschränkung war, dass bereits das Betreten des Raumes zu einem Erwachen der Tiere (Arousal Reaktion) mit entsprechenden Auswirkungen auf Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität führt, die man in den Kurvenverläufen vor dem Eingriff sehen kann. Mit einer maximalen Zahl von 8 Kontroll- oder Versuchstieren konnte die Durchführung der Manipulationen auf eine akzeptable Zeit begrenzt werden und durch die rotierende Versuchsanordnung (siehe Abschnitt 3.3.1, Tabelle 3.5) verteilt sich der verbleibende Zeiteffekt gleichmäßig auf alle Gruppen.

### 5.1.4 Versuchsaufbau: Methoden der Kennzeichnung

Für die verschiedenen Methoden der Ohrkennzeichnung war es ausreichend, eine einzige Kontrollgruppe zu bilden, da die verschiedenen Formen stets die gleiche Art der Fixierung notwendig machten. Das Setzen sowie das Ablesen sämtlicher Kennzeichnungen erfolgte abermals zwischen 9:00 und 10:00 Uhr. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Blutentnahme und Kennzeichnung ist somit problemlos möglich. Das Tragen der Kennzeichnung wurde über einen Gesamtzeitraum von vier Wochen täglich aufgezeichnet. Aufgrund der großen Datenmenge (alle 10 Sekunden 3 Werte) wurden nur beispielhaft einzelne Tage abgebildet. Hierbei wurde sich für die Wochentage Samstag und Sonntag entschieden, da dort erfahrungsgemäß die wenigsten Störungen im Tierhaus stattfinden und die Mäuse weitgehend unbeeinflusst sind. Auf Grund des Studiendesigns entspricht das für alle Mäuse den Tagen 5/6, 12/13, 19/20 und 26/27 (Tag 1 = Tag des Markierens). Die zeitliche Begrenzung der Messungen auf eine Tragedauer von vier Wochen ist der limitierten Batterieleistung des Transmitters geschuldet. Im Anschluss an das Tragen der Kennzeichnung sollte die Belastung durch den Auslesevorgang ermittelt werden. Die jeweils dazu nötige Fixierung war für p-Chip, RapID und Ohrmarke eindeutig. Zum Erkennen der Ohrlochung reicht es in der Regel aus, die Tiere kurz auf den Gitterdeckel des Käfigs zu setzen. Dennoch kann es natürlich vorkommen, dass es Schwierigkeiten beim Ablesen gibt und die Maus deshalb mittels Nackengriff fixiert werden muss. Die Belastung hierbei wäre dann vergleichbar mit dem Ablesen einer Ohrmarke (visuelles Ablesen mit Fixierung im Nackengriff). Bei der Kontrollgruppe wurde lediglich der Käfigdeckel geöffnet. Dies ist ausreichend um Tiere unterschiedlicher Fellfarbe, farblich markierte oder stellenweise geschorenen Tiere zu unterscheiden. Gleichzeitig erkennt man die Stressbelastung, die durch das alleinige Öffnen des Käfigs entsteht.

Anzumerken ist, dass Mäuse zum Zeitpunkt ihrer Kennzeichnung üblicherweise jünger sind als dies in der vorliegenden Studie der Fall war. Durch die Implantation des Transmitters und die sich anschließende Rekonvaleszenzzeit ergab sich jedoch ein Mindestalter von 14 Wochen. Bei älteren und demnach größeren Tieren kann aber bei einigen Kennzeichnungen ein größerer Gewebeschaden mit möglicherweise sogar schlechterer Heilungstendenz entstehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten deshalb eine größere Belastung anzeigen als im Routinebetrieb zu erwarten ist. Dem entgegenzuhalten ist der Umstand, dass ältere Tiere bereits häufiger „gehandelt“ wurden und dies möglicherweise zu einer verringerten Stressreaktion führen könnte. Eine häufige Methode zur Kennzeichnung von Neonaten ist die Zehentätowierung, die aber nicht telemetrisch untersucht werden konnte, da die Telemetrietechnik eben auf ein Mindestalter und -gewicht angewiesen ist.

### 5.1.5 Versuchsaufbau: Chronisches Stressmodell

Da bei diesem komplexen Tierversuch mehrere Stressoren kombiniert werden, die Telemetrieanlage aber bedingt durch ihre technischen Möglichkeiten nur eine limitierte Anzahl an Tieren messen kann, konnte nicht für jeden Stressor eine eigene Kontrollgruppe mitgeführt werden. Dies führte dazu, dass beide Gruppen Western Diät erhielten. Gleichzeitig ermöglichte dies, die Tiere für Fragestellungen zu einer eventuellen Wirkung der Stressfaktoren auf die Atherosklerose der  $\text{Apoe}^{-/-}$  Mäuse post mortem zu verwenden. Es wurde entschieden, die transmitterimplantierte Versuchsmaus nach erfolgter Phase der Einzelhaltung stets mit dem selben Partner zusammen zu setzen. Dass dies nicht immer dem versuchstierkundlichen Alltag entspricht, ist bekannt. Gleichzeitig war es notwendig, den verschmutzten Käfig auch in der Kontrollgruppe regelmäßig zu reinigen sowie Einstreu, Futter und Trinkwasser zu wechseln. Diese Grundversorgung wurde wöchentlich in beiden Gruppen zu Beginn der Woche (Montag; Tag 1) durchgeführt und ist natürlich auch mit einem Stress für die Kontrollgruppe verbunden. Dies erschwert zwar die Interpretation der Daten an diesem Tag, ist aber aus Tierschutzgründen zwingend notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich darum bemüht der *Reduce*-Komponente des 3R-Prinzips gerecht zu werden. Deshalb sollten zusätzliche wissenschaftliche Fragen im Zusammenhang von chronischem Stress und Atherosklerose beantwortet werden, die nicht Teil dieser Arbeit sind. Hierfür wurde in beiden Gruppen Blut entnommen (siehe Kapitel 3.3.3) und die getöteten Tiere nach Versuchsende für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

### 5.1.6 Interpretation der statistischen Signifikanz

Die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 1. Art zu begehen (die irrtümliche Annahme der Alternativhypothese) steigt mit der Anzahl der durchgeführten Tests. Bei einem Signifikanzniveau von 5% bedeutet dies, dass in 1 von 20 Fällen die Nullhypothese (es gibt keinen Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe) fälschlicherweise zurückgewiesen wird. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit nur eine Häufung von Signifikanzen bei den verschiedenen Parametern sowie in den verschiedenen Zeitfenstern als ein tatsächlicher Effekt interpretiert. Dies entspricht im weitesten Sinne einer Form der ‘multiplen testing Korrektur’.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Beurteilung der verschiedenen Methoden der Blutentnahme

Zur Beurteilung der Belastung von Mäusen durch unterschiedliche Methoden der Blutentnahme wurden die telemetrisch erhobenen Daten von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität in drei Auswertungsphasen zusammengefasst. Die *Akute Phase* bildet hierbei die Rohdaten der Telemetrieanlage (ein Wert alle 10 Sekunden) im Zeitintervall von 5 Minuten vor bis 5 Minuten nach dem Eingriff ab. In der *Arousal Phase* wurden die Rohdaten dann über 5-Minuten-Intervalle gemittelt und über den Zeitraum von 1 Stunde vor bis 1 Stunde nach dem Eingriff abgebildet. Der *Tag/Nacht-Rhythmus* wurde beurteilt, in dem auf 1 Stunde zusammengefasste Werte vom Tag vor dem Eingriff bis 2 Tage nach dem Eingriff ausgewertet wurden. Genauer findet sich in Abschnitt 3.3.1. Die aufgeführten Untersuchungsintervalle wurden aus mehreren Gründen gewählt. Zum einen sollte festgestellt werden, ob sich der sicherlich vorhanden Punktionsschmerz in der akuten Phase darstellt. Zum anderen sollte herausgefunden werden, ob der Eingriff eventuell Einfluss auf die Arousal Reaktion hat. Und schließlich sollte geklärt werden, ob dieser einmalige Eingriff den Tag/Nacht-Rhythmus der Tiere beeinflusst. Alle Auswertungsphasen umfassen eine ausreichend lange Beobachtungszeit vor dem Eingriff, um eventuelle Auffälligkeiten von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität bereits vor der Manipulation zu erkennen.

#### Kategorien von Eingriffen

Es ist generell bekannt, dass jegliche Manipulation der Mäuse in ihrer Inaktivitätsphase zu einer charakteristischen Reaktion von Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität durch Aktivierung des zentralen Nervensystems und erhöhter Reaktionsbereitschaft führt [Balcombe et al., 2004]. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lassen sich vier unterschiedliche Kategorien bilden: Blutentnahme mit Narkose, Blutentnahme ohne Narkose, Fixierung im Nackengriff und Fixierungen ohne Nackengriff. Die Abbildungen zeigen deutlich, dass Blutentnahmemethoden ohne Narkose (Schwanzvene, V. saphena, V. facialis) sich von Methoden mit Narkose (retrobulbärer Venenplexus) unterscheiden. Ebenso führt eine Fixierung im Nackengriff zu einem anderen Verlauf der gemessenen Parameter als andere Techniken der Fixierung.

**Blutentnahme ohne Narkose** Zur Punktion der Vena saphena, der Schwanzvene und der Vena facialis ist keine Narkose notwendig. Interessanterweise unterscheiden sich die Kontrollen aller Gruppen untereinander kaum und zeigen einen charakteristischen stammspezifischen Verlauf in allen Auswertungsphasen. Auch in den

unterschiedlichen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der Blutentnahme aus der Vena facialis, ist dies feststellbar. Die typische akute Phase des B6 Stammes ist charakterisiert durch einen sukzessiven Anstieg der Herzfrequenz bereits vor der Punktion, maximale Werte um den Moment des Eingriffs und ein mehr oder weniger stabiles Herzfrequenzplateau über die gemessenen 300 Sekunden nach dem Eingriff. Es ist beachtenswert, dass sowohl die Kontrolltiere als auch die Experimentaltiere während dieser Plateauphase häufig einen geringen Standardfehler der Herzfrequenz zeigen. Das Ansteigen der Herzfrequenz bereits vor dem Zeitpunkt der Punktion wird in der Arousal Phase besonders deutlich. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass bereits das bloße Betreten des Raums sowie das Öffnen des Käfigs zu einer Reaktion bei den Mäusen führt. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass die akute murine kardiovaskuläre Stressreaktion im Rahmen obengenannter Blutentnahmen (mit Ausnahme der Vena facialis) durch die Fixierungskomponente alleine bestimmt wird und sich ein physikalischer Schmerz telemetrisch nicht abbildet. Dass die deutlich sichtbare Arousalreaktion während der Helligkeitsperiode den Tag/Nacht-Rhythmus von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität von B6 und BALB/c Mäusen beeinflusst, kann mit den vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden. Wie zu erwarten, erweist sich die Telemetrie als eine geeignete Methode zur Darstellung des zirkadianen Rhythmus bei Mäusen. Dieser zirkadiane Rhythmus ist in den untersuchten Stämmen weitestgehend gleich. Beim B6 Stamm zeigt sich der Eingriff auch im Tag/Nacht-Rhythmus, beim BALB/c Stamm nicht.

**Blutentnahme mit Narkose** Die kurze Isoflurannarkose zur retrobulbären Blutentnahme führt zu einem abweichenden Kurvenverlauf in der akuten Phase sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe. Mit Beginn der Inhalationsnarkose sinkt die Herzfrequenz, welche jedoch unmittelbar mit Beendigung der Narkosegaszufuhr wieder ansteigt. Dieser Verlauf wurde ebenfalls von Arras et al. beschrieben [Arras et al., 2007b]. Im Anschluss an die Narkose weisen die Tiere ein hyperaktives Verhalten mit deutlich höherer Aktivität auf. Da diese Erregung in beiden Gruppen vorkommt, muss sie unabhängig von der Blutentnahme und eine Folge der Narkose sein. Die Narkose induziert allerdings nur kurzfristige Veränderungen, die in der akuten Phase sichtbar werden. Die Arousal Phase und die Tag/Nacht-Rhythmik der narkotisierten Tiere unterscheiden sich nicht mehr von denen der nicht-narkotisierten Tiere, sodass die Inhalationsnarkose mit Isofluran offensichtlich nur sehr kurzfristige Effekte hat.

**Fixierung im Nackengriff** Zur Punktion der Vena facialis müssen die Mäuse im Nackengriff fixiert werden. Diese Fixierung ist, um dies vorweg zu nehmen, auch zum Setzen und Ablesen verschiedener Ohrmarkierungen notwendig und resultiert in allen Fällen in einem rapiden und starken Absinken der Herzfrequenz zum Zeitpunkt des Eingriffs. Möglicherweise übt diese Form der Fixierung, in Verbindung mit daraus resultierenden veränderten Druck- und Stauungsvorgängen im Halsbereich, einen

dämpfenden Effekt auf den Kreislauf aus.

### **Stammunterschiede**

Deutliche Unterschiede können zwischen den verschiedenen Mausstämmen identifiziert werden. Bei B6 Mäusen bildet die Herzfrequenz in der akuten Phase nach dem Eingriff ein Plateau mit hohen Werten von bis zu 750 Herzschlägen pro Minuten und einem kaum vorhandenen Standardfehler aus. Die BALB/c Mäuse in dieser Phase erreichen im Mittel nur Herzfrequenzen von 680 Schlägen pro Minute mit zwar reduziertem, aber weiterhin deutlichem Standardfehler. Die Normalisierung aller Werte ist bei den BALB/c Mäusen insgesamt früher erreicht. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass C57BL/6J Mäuse stressempfindlicher sind. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Mogil et al. zum unterschiedlichen Schmerzempfinden bei Inzuchtlinien [Mogil et al., 1999]. Allerdings zeigten Belzung und Griebel wiederum, dass BALB/c Mäuse in vielen Fällen ängstlicher reagieren als beispielsweise C57BL/6 Mäuse [Belzung and Griebel, 2001].

### **Signifikante Einflüsse der Blutentnahmetechnik**

**Vena saphena** Es können keine gehäuften signifikanten Unterschiede zwischen der Blutentnahme- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Lediglich in der akuten Phase sind signifikante Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen beiden B6 Gruppen messbar. Da die Tiere in der Versuchsgruppe niedrigere Herzfrequenzen als die Kontrollen aufweisen und es keine Häufung von Signifikanzen bei anderen Parametern oder Messphasen gibt wird der gemessene signifikante Unterschied als zufällig interpretiert. Es ist also nicht davon auszugehen, dass bei dieser Blutentnahmemethode eine Belastung gegeben ist, die über die Fixierungskomponente hinaus geht.

**Schwanzvene** Eine Häufung von signifikanten Unterschieden zwischen Versuchs- und Kontrolltieren kann nicht beobachtet werden. Der gemessene Unterschied der Körpertemperatur zwischen B6 Versuchs- und Kontrolltieren in der Arousal Phase stellt die einzige signifikante Abweichung nach dem Eingriff dar und wird als Zufall interpretiert. Eine über die Fixierung hinausgehende Belastung wird weder für B6 noch für BALB/c Mäuse erkennbar.

**Vena facialis** Bei B6 Mäusen ist nach Blutentnahme aus der Vena facialis ein von der Kontrolle abweichender Herzfrequenz- und Körpertemperaturverlauf in der akuten Phase zu beobachten. Hierbei lassen sich in der Versuchsgruppe zwei klar unterschiedliche Reaktionsmuster feststellen. Die mittlere Herzfrequenz der Mäuse einer Teilgruppe entspricht ungefähr der der Kontrolltiere. Die andere Teilgruppe weist in der akuten Phase reduzierte Herzfrequenzen auf. Zur Zeit finden sich in der Literatur keine Hinweise auf ähnliche Beobachtungen oder Erklärungen für diesen Verlauf.

Man kann vermuten, dass bei den Tieren der 2. Teilgruppe bei der Punktion vegetative Nervenfasern getroffen worden sind, was zu dem beobachteten Abfallen der Herzfrequenz führt. Ob es sich hierbei um Teile des Nervus facialis, beispielsweise den Ramus marginals mandibulae n. facialis oder den Ramus buccalis ventralis n. facialis, handelt oder um andere Nerven, ist aktuell nicht zu beurteilen [Popesko et al., 1990]. Histologische Untersuchungen in der entsprechenden Teilgruppe wären nötig um möglicherweise Aufschluss zu geben. Nach der Blutentnahme aus der Vena facialis ist bereits in der Arousal Phase eine bis zu zwei Stunden lang erhöhte Herzfrequenz bei punktierten B6 Mäusen zu beobachten, die in der Tag/Nacht-Übersicht ebenfalls erkennbar ist. Nach diesen zwei Stunden nimmt die Herzfrequenz aber wieder ab und die Kurven von Versuchs- und Kontrolltieren verlaufen wieder ähnlich. Signifikante Unterschiede können sowohl parameter- als auch phasenübergreifend für B6 Mäuse festgestellt werden. So sind in der akuten Phase nach der Blutentnahme signifikante Unterschiede für Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zwischen beiden Gruppen feststellbar. In der Arousalphase unterscheiden sich Herzfrequenz und Aktivität der Versuchsgruppe weiterhin signifikant von der Kontrolle. Die Blutentnahme aus der Vena facialis scheint folglich, zumindest für C57BL/6J, eine Belastung darzustellen, die über die alleinige Fixierung hinaus geht.

**Retrobulbärer Venenplexus** In der akuten Phase sind nur Unterschiede der Körpertemperatur zwischen beiden Gruppen nach der Punktion signifikant. Wenn auch nicht statistisch belegt, deutet die höhere Herzfrequenz in der Blutentnahmegruppe in dieser Phase ebenfalls auf eine Belastung durch die Punktion hin. Nach Punktion des retrobulbären Venenplexus sind am Tag der Blutentnahme zeitraumspezifisch signifikante Unterschiede der Tag/Nacht-Rhythmik der Herzfrequenz zu erkennen. Eine konstant leicht erhöhte Herzfrequenz ist in der kompletten Inaktivitätsphase von Tag 0 zu beobachten, hält aber nicht über diesen hinaus an. Insgesamt wird die retrobulbäre Blutentnahme in der Literatur kontrovers diskutiert [Christensen et al., 2009, Diehl et al., 2001, van Herck et al., 2001, van Herck et al., 2000, van Herck et al., 1997, van Herck et al., 1992]. Die vorliegenden telemetrischen Analysen liefern kaum Anhaltspunkte für eine über die Fixierung hinaus gehende Belastung der Tiere. Dies steht im Widerspruch zu Publikationen die auf retrobulbäre Schäden bei dieser Technik hinweisen [van Herck et al., 2000, van Herck et al., 1992].

### **Fazit und Beurteilung im Kontext vorheriger Arbeiten**

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass eine Punktion der Vena facialis zu einer Belastung bei B6 Mäusen führt. Durch das blinde und tiefe Stechen bei dieser Methode können tiefliegendes Gewebe und insbesondere Nerven verletzt werden. Schlichting kommt nach Auswertung des Open-Field-Tests und der Kortikosteronkonzentration ebenfalls zu dem Schluss, dass eine Punktion der Vena facialis zu den eher stärker belastenden Blutentnahmemethoden zählt [Schlichting,

2010]. Anders als bei Schlichting kann mit den vorliegenden Telemetriedaten jedoch keine eindeutig schonendste Entnahmemethode bestimmt werden. Überhaupt ist ein direkter quantitativer Vergleich zwischen den einzelnen Entnahmemethoden, wie er z.B. von Aasland oder Madetoja durchgeführt wurde, mit den vorliegenden telemetrischen Daten schwierig [Aasland et al., 2010, Madetoja et al., 2009].

Schlichting bezeichnet eine Blutentnahme aus der Vena saphena als am wenigsten stressvoll. Eine über die Fixierung hinausgehende Belastung konnte auch mit den vorliegenden telemetrischen Daten für die Punktion der Vena saphena nicht festgestellt werden. Des Weiteren benennt Schlichting auch eine Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus als wenig belastend. Die telemetrischen Daten hierzu zeigen eine länger anhaltende und höhere Herzfrequenz nach retrobulbärer Blutentnahme, sodass man annehmen könnte, dass eine über die Fixierung hinausgehende Belastung vorliegt auch wenn keine gehäuften signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren gemessen wurden. Ziegler hat im Rahmen ihrer Arbeit die retrobulbäre Blutentnahme histologisch untersucht [Ziegler, 2012]. Ihre Untersuchung sowohl eine Stunde als auch drei Tage nach Punktion mit einer Hämatokritkapillare zeigten für diese Blutentnahme die zweithäufigsten histologischen Veränderungen. Eine Einschätzung dieser histologischen Beobachtungen ist auf Grund unterschiedlicher Heilungstendenz und Gewebezusammensetzung jedoch problematisch.

Schlichtings generelle Schlussfolgerung, dass jegliche Blutentnahme zu Stress zu führen scheint, lässt sich prinzipiell bestätigen. Darüberhinausgehend kann sogar festgehalten werden, dass bereits jegliche Fixierung im Rahmen einer Blutentnahme zu Stress führt, wenn sie in der Inaktivitätsperiode der Tiere durchgeführt wird. Dieser Stress ist, wie zuvor auch von Mogil et al. erkannt, bei B6 Tieren ausgeprägter [Mogil et al., 1999].

Bezugnehmend auf Abschnitt 3.1 (*Fragestellung und Methodenwahl*) lässt sich oben genanntes folgendermaßen zusammenfassen: Für die meisten Blutentnahmemethoden liegt keine Belastung vor, die über die Fixierungskomponente hinausgeht. Eine Ausnahme hiervon bildet die Punktion der Vena facialis. Sie scheint die belastendste Methode zu sein. Die Belastungen belaufen sich in vielen Fällen auf ungefähr eine Stunde, für einige Methoden auch etwas länger. Dies führt jedoch zu keinen erheblichen Auswirkungen auf den langfristigen Tag/Nacht-Rhythmus der Mäuse. Stammspezifische Unterschiede sind deutlich zu erkennen wobei hier die C57BL/6 Mäuse sensibler und ausgeprägter reagieren.

## 5.2.2 Beurteilung der verschiedenen Methoden der Kennzeichnung

Zur Beurteilung wurden die telemetrisch erhobenen Daten von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität erneut in die drei Auswertungsphasen *Akute Phase*, *Arousal Phase* und *Tag/Nacht-Rhythmus* zusammengefasst. Zusätzlich wurde der *Tag/Nacht-*



*Rhythmus des Tragens* aller verwendeten Kennzeichnungsmethoden an den Tagen 5/6, 12/13, 19/20 und 26/27 mit für 1 Stunde gemittelten Werte abgebildet. Die Versuche wurden nur in B6 Mäusen durchgeführt.

### Kategorien von Eingriffen

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen im Allgemeinen keine Unterschiede zwischen einer Kennzeichnung am Ohr oder am Schwanz. Für einige Kennzeichnungsformen besteht zudem kein telemetrisch messbarer Unterschied zwischen dem Anbringen und dem Ablesen der Markierung. Das Ablesen erfolgt bei einigen Kennzeichnungsformen deutlich zügiger als das Anbringen der Kennzeichnung verbunden mit dem Fehlen eines schmerzhaften Eingriffs. Aus diesen Gründen kommt es wohl beim Ablesen zu einer schnelleren Normalisierung der Herzfrequenz in der akuten Phase.

**Fixierung im Nackengriff** Die Anbringung von Ohrloch, Ohrmarke, RapID und die entsprechende Kontrolle sowie das Ablesen von Ohrmarke und RapID beinhalten eine Fixierung im Nackengriff. Bei diesen Gruppen kommt es unmittelbar zum Zeitpunkt des Eingriffs zu einem deutlichen Absinken der Herzfrequenz. Diese Reaktion war ebenfalls bei den Methoden der Blutentnahme, die eine Fixierung im Nackengriff beinhalteten, zu beobachten. Dieser Effekt ist bei Applikation des p-Chips, zugehöriger Fixierung oder bei den restlichen Gruppen im Rahmen des Ablesevorgangs nicht zu beobachten. Wie bereits diskutiert, könnte diese Form der Fixierung, in Verbindung mit daraus resultierenden veränderten Druck- und Stauungsvorgängen im Halsbereich, einen dämpfenden Effekt auf den Kreislauf ausüben.

### Signifikante Unterschiede

**Ohrloch** Es können in keinem Auswertungszeitraum signifikante Unterschiede beim Setzen der Ohrlochung zwischen markierten Tieren und Tieren, die lediglich als Kontrolle fixiert wurden, festgestellt werden. Auch das vierwöchige Tragen führt bei den Versuchstieren zu keinen signifikanten Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollen. Zeitraumsspezifisch signifikante Unterschiede der Herzfrequenz und Körpertemperatur treten lediglich beim Ablesen der Ohrlochung in der Arousal Phase auf. Der Kurvenverlauf unterscheidet sich anfangs nicht zwischen den beiden Gruppen. Erstaunlicherweise fällt die Herzfrequenz und die Körpertemperatur in der Versuchsgruppe aber nach 30 min deutlich langsamer ab als in der Kontrollgruppe. Es ist nicht davon auszugehen, dass dieser Umstand mit dem Ablesevorgang in Zusammenhang steht. Insgesamt kann für das Setzen, Tragen und Ablesen der Ohrlochung keine Belastung, die über der Fixierungskomponente liegt, erkannt werden.

**Ohrmarke** Das Anbringen einer Ohrmarke führt zu parameter- und phasenübergreifenden signifikanten Unterschieden zu den Kontrollen. In der Arousal Phase un-

terscheidet sich die Herzfrequenz über 120 Minuten und die Körpertemperatur zeitraumsspezifisch über 60 Minuten signifikant von der Kontrolle. Untersuchungen zum Tag/Nacht-Rhythmus zeigen für alle drei Parameter signifikante Unterschiede am Tag des Eingriffs (Tag 0). Diese gehäuften signifikanten Unterschiede weisen auf eine Belastung durch diese Kennzeichnungsmethode hin. Die Anwesenheit eines größeren Fremdkörpers am Ohr induziert offensichtlich eine verstärkte Reaktion und verhindert ein schnelles Beruhigen, wie es nach anderen Kennzeichnungsformen eintritt. Ob es sich hierbei um eine physikalische Schmerzreaktion oder eher um eine Irritation durch den Fremdkörper handelt ist schwierig abzuschätzen. Die signifikanten Unterschiede zwischen Ohrmarken- und Kontrollgruppe sind nicht anhaltend, sodass bereits ab Tag 1 und über die nachfolgenden vier Wochen kein Unterschied mehr gemessen werden kann. Das Ablesen der Ohrmarke zeigt eine zeitraumsspezifisch signifikant unterschiedliche Herzfrequenz in der akuten Phase nach dem Eingriff. Körpertemperatur und Aktivität unterscheiden sich an Tag 0 signifikant von der Kontrollgruppe. Da die Herzfrequenz im Tag/Nacht-Rhythmus keine Unterschiede zeigt und signifikante Unterschiede in der Temperatur auch schon am Tag vor dem Ablesen auftreten, ist es unwahrscheinlich, dass die gemessene Erregung durch den visuellen Ablesevorgang entstanden ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Anbringen einer Ohrmarke eine Belastung induziert, die über der der bloßen Fixationskontrolle liegt.

**RapID** Die Kennzeichnung mittels RapID führt nach dem Anbringen zu signifikanten Unterschieden der Körpertemperatur in der akuten Phase. Rückschlüsse daraus sind jedoch nicht möglich, da dieser Unterschied bereits vor dem Eingriff besteht. In der Arousal Phase kann jedoch eine signifikant erhöhte Herzfrequenz über 120 Minuten nach dem Setzen gemessen werden. Ebenso wie bei dem Anbringen der Ohrmarke lässt sich dabei nicht feststellen, ob es sich um eine physikalische Schmerzreaktion oder lediglich eine Irritation durch den Fremdkörper handelt. Im Unterschied zur Ohrmarke nimmt die RapID Markierung keinen Einfluss auf den Tag/Nacht-Rhythmus, weder am Tag des Eingriffs noch im Verlauf des vierwöchigen Tragens. Das Ablesen führt in keinem der drei Analysezeiträume zu statistisch signifikanten Unterschieden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass wohl auch die Anbringung der RapID Ohrmarke zu einer Belastung führt, die über dem Niveau einer alleinigen Fixierung liegt.

**p-Chip** Eine Häufung von signifikanten Unterschieden zwischen gekennzeichneten und Kontrolltieren kann nicht beobachtet werden. Setzen, Tragen und Ablesen führen in keinem Analysezeitraum zu signifikanten Unterschieden zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Lediglich die Aktivität ist in der akuten Phase des Ablesens zeitraumsspezifisch erhöht, lässt aber durch signifikante Unterschiede bereits vor dem Ablesen keine Interpretation zu. Insgesamt lässt sich keine über die Fixierung hinausgehende Belastung durch das Setzen, Tragen oder Ablesen des p-Chips feststellen.

## Fazit und Beurteilung im Kontext vorheriger Arbeiten

Die Verwendung des p-Chips ist eine ausgezeichnete Methode zur Kennzeichnung von Mäusen. Wie schon bei der Blutentnahme aus der Schwanzvene festgestellt werden konnte, stellt die Punktion der Haut und Unterhaut am Schwanz insgesamt keine Belastung dar, die über die Fixierungskomponente hinaus geht. Da zur p-Chip Implantation eine Kanüle mit 21 G Außendurchmesser verwendet wird, kommt es nicht zu wesentlich größeren Gewebeschäden als dies im Rahmen einer Blutentnahme mittels 23 G Kanüle der Fall ist. Die Ohrlochung stellt ebenfalls eine schonende Kennzeichnungsmethode dar. Die Stanzung, die als schmerzvollster Moment angesehen werden muss, scheint keinen größeren Stress auszulösen.

Die mitgeführte Kontrollgruppe beim Ablesevorgang wurde nur durch ein Öffnen des Käfigdeckels gestört. Dies würde ausreichen um beispielsweise farblich markierte Tiere zu unterscheiden. Offensichtlich genügt diese Maßnahme jedoch bereits, um eine zwar leicht verkürzte aber insgesamt vergleichbare *Akute Phase* Reaktion zu induzieren, wie sie sonst nur nach direkter Manipulation der Tiere zu beobachten ist.

Das Anbringen von Fremdkörpern wie Ohrmarke oder RapID führt offensichtlich zu einer stärkeren Reaktion der Tiere. Möglicherweise wird alleine durch das Gewicht oder die Irritation durch den Fremdkörper diese Reaktion ausgelöst; vermehrte Schmerzen durch das Anbringen sind aber auch möglich.

Die Ohrmarke führt dabei zu einer deutlich höheren und länger anhaltenden Stressreaktion als die RapID. Sie ist von allen getesteten Markierungsformen die belastendste. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von Dahlborn et al., die die Ohrmarke ebenfalls als schlechteste Form der Kennzeichnung benennen [Dahlborn et al., 2013]. Als zusätzlich belastend benennen sie und andere Autoren die erhöhte Infektionsgefahr, die höhere Tumorzinzidenz und die Gefahr allergischer Reaktionen [Kasanen et al., 2011, Kitagaki and Hirota, 2007].

Die telemetrischen Ergebnisse dieser Arbeit stellen p-Chip und Ohrlochung als schonendste Formen der Kennzeichnung dar. Cinelli et al. konnten in telemetrischen Untersuchungen zur Biopsieentnahmemethoden zeigen, dass die Ohrlochung den gleichen Effekt auf Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität ausübt wie die Fixierung alleine [Cinelli et al., 2007]. Alle drei Parameter kehrten nach einer Stunde wieder auf Ausgangswerte zurück. Diese Aussagen lassen sich durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigen. Telemetrische Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe konnten ebenfalls zeigen, dass die Herzfrequenz nach verschiedenen Methoden der Kennzeichnung (u.a. Ohrlochung) nach circa einer Stunde wieder auf ihr Ruheniveau zurückkehrt [Kasanen et al., 2011].

Bezugnehmend auf Abschnitt 3.1 (*Fragestellung und Methodenwahl*) lässt sich oben genanntes folgendermaßen zusammenfassen: Unterschiedliche Kennzeichnungsformen sind unterschiedlich belastend. Eine Kennzeichnung mittels Ohrloch oder p-Chip stellt weder beim Setzen noch beim Lesen eine über die Fixierungskomponente hinausgehende Belastung dar. Hierbei ist die Stressantwort auf eine Stunde begrenzt.

Das Anbringen einer Ohrmarke ist ein belastender Eingriff und führt zu einer markanten Stressreaktion der Mäuse, die den kompletten Tag des Eingriffs anhält. Das Anbringen der RapID scheint belastender zu sein als Ohrlochung, p-Chip oder Kontrolle. Die Belastung ist aber von kürzerer Dauer als der Stress nach Applikation einer Ohrmarke. In den ersten vier Wochen stellt das Tragen aller Kennzeichnungsformen selbst keine weitere Belastung dar. Veränderungen im Tag/Nacht-Rhythmus können ab dem auf den Eingriff folgenden Tag nicht mehr festgestellt werden, sodass ein kurzer Abstand zwischen Kennzeichnung und Beginn eines Experimentes genügt, um Interferenzen zu verhindern.

### 5.2.3 Beurteilung des chronischen Stressmodells

Die zur Analyse des chronischen Stressmodells eingesetzte Übersichtsdarstellung des Tag/Nacht-Rhythmus ist gut geeignet um eine interessante Entwicklungen aller telemetrisch erfassten Parameter aufzuzeigen. Das Ergebnis dieser Darstellung ist der überwiegend signifikante Anstieg aller Parameter (Abbildung 4.35, 4.36 und 4.37; vergleiche Woche 1 zu Woche 5)), der mit der Fütterung der atherogenen Western Diät zusammenfällt und mit großer Wahrscheinlichkeit durch diese verursacht wurde. Einen Zusammenhang zwischen dem Kaloriengehalt des Futters und der kardiovaskulären Stimulation konnten bereits Williams et al. feststellen [Williams et al., 2002]. Ihre telemetrischen Untersuchungen an C57BL/6J Mäusen zeigten eine reduzierte Herzfrequenz als Folge reduzierter Energiezufuhr bei gleichbleibender Raumtemperatur. Offensichtlich hat die fett- und cholesterinreiche Ernährung im Rahmen des vorliegenden Versuches einen positiven Einfluss auf den Metabolismus und lässt alle telemetrisch erfassten Parameter ansteigen. Betrachtet man die Übersichtsdarstellung der Herzfrequenz über die komplette Versuchszeit hinweg, fällt auf, dass die gestressten Mäuse in der Inaktivitätsperiode eine zum Teil signifikant höhere Herzfrequenz besitzen. Dieser Effekt lässt sich durch Störungen in der Ruheperiode der Tiere erklären, die mit dem wiederholten Wecken beim Käfigwechsel und dem eventuellen Stress der Einzelhaltung einhergehen. Bemerkenswerterweise zeigen die Herzfrequenzen der Aktivitätsperiode (Dunkelperiode) einen umgekehrten Trend. Hier zeigen die gestressten Tiere niedrigere Werte im Vergleich zu den nicht gestressten Kontrollen. Offensichtlich führt die chronische Stressbelastung am Tag in allen Versuchswochen zu einer Erholung in der Nacht. Der deutliche Unterschied zwischen den Herzfrequenzwerten beider Gruppen in der Helligkeitsperiode von Versuchswoche 1 (Abbildung 4.35) erklärt sich durch zwei Komponenten: Das chronische Stressregime mit seinen Störungen in der Ruheperiode führt zu einer erhöhten Herzfrequenz der gestressten Mäuse. Die in den nachfolgenden Wochen ebenfalls ansteigende Herzfrequenz der ungestressten Mäuse steht im Zusammenhang mit der Western Diät, die aber erst ab Versuchswoche 5 verabreicht wurde, und deren Einfluss in Versuchswoche 1 noch nicht vorhanden ist.

Betrachtet man den Tag/Nacht-Rhythmus der ersten Versuchswoche, so fällt auf, dass sowohl regelmäßiger Käfigwechsel als auch Phasen mit Einzelhaltung zu beeinträchtigten Ruhephasen in der Helligkeitsperiode führen. Dieser „Schlafmangel“ der gestressten Mäuse während der Helligkeitsperiode führt zwar an den „Stress-Tagen“ selbst zu keiner Beeinflussung der nächtlichen Aktivitätsphase, jedoch kommt es bemerkenswerterweise an Tag 7, an dem die Tiere nicht gestresst wurden, zu deutlichen Ruhephasen in der Dunkelperiode. Im Unterschied zur Kontrollgruppe scheinen die gestressten Tiere ihre Störungen also gegen Ende der Woche zu kompensieren wenn der Stress „nachlässt“ (Abbildung 4.38). Betrachtet man die Tag/Nacht-Rhythmen im weiteren Verlauf bis hin zu Versuchswoche 17 sind zwei Trends erkennbar: Zum einen scheinen mit steigender Versuchsdauer deutlich vermehrte Ruhephasen bei den gestressten Mäusen notwendig zu sein. Diese als Erholungsphasen interpretierten Zeiten finden während der Dunkelperiode statt und betreffen die Wochentage 5, 6 und 7. Zum anderen findet offensichtlich eine Gewöhnung der Tiere an die Stressoren insofern statt, als die Mäuse zu Versuchsende deutlich weniger reagieren als zu Versuchsbeginn. Dieser Gewöhnungseffekt tritt insbesondere in der zweiten Wochenhälfte auf. Bereits die Untersuchungen von Kramer et al. zeigten, dass eine Gewöhnung von Mäusen, wenn auch nicht vollständig, an Handling stattfinden kann [Kramer et al., 2004]. Ähnlich verhält es sich offensichtlich mit den hier eingesetzten Stressoren. Samstag und Sonntag fanden keine Manipulationen statt, sodass die Tiere offensichtlich montags/dienstags (entspricht Tag 1 und Tag 2) wieder deutlicher reagierten als gegen Ende der Woche (Tabelle 4.42). Die Aussage von Meijer et al., dass auch wiederholtes Handling einen milder Stressor darstellt, lässt sich so bestätigen [Meijer et al., 2006, Meijer et al., 2007].

Die mittleren Körpergewichte (Abbildung 4.43) sowohl der ungestressten als auch der gestressten Tiere nehmen mit steigendem Alter kontinuierlich zu. Ein auseinander weichender Trend beider Kurven ist zu erkennen, erreicht aber keine statistische Signifikanz. Die Beobachtung von Martí et al., dass vermehrter Stress die Futteraufnahme reduziert, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen somit nicht bestätigen [Martí et al., 1994]. Schwache Stressoren, wie im vorliegenden Versuch bewusst eingesetzt, üben keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Tiere aus.

## 5.3 Gesamtdiskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die Herzfrequenz ein geeigneter Parameter zur Messung der Stressbelastung ist. Die schnelle Regulation durch das sympathische und parasympathische Nervensystem führen zu einer unmittelbaren Reaktion auf den Stressor und erlauben eine präzise Einschätzung der Belastungsdauer. Dabei steigt, dem allgemeinen Verständnis entsprechend, die Herzfrequenz unter Belastung im Rahmen der Fight-or-flight-Reaktion an. Dies deckt sich mit den Erfahrungen mehrerer Autoren, die die Herzfrequenz als einen geeigneten Stresspara-

meter sehen [Arras et al., 2007a, Arras et al., 2007b, Meijer et al., 2006, Harkin et al., 2002, van den Buuse et al., 2001].

Die vorliegende Arbeit zeigt eindrücklich, dass für viele Routineeingriff an Versuchsmäusen das Handling die belastungsrelevante Komponente ist. Hierbei soll nicht in Frage gestellt werden, dass die untersuchten Manipulationen (Blutentnahme und Kennzeichnung) zu einer Schmerzreaktion führen. Diese spiegelt sich in der Regel aber nicht zusätzlich in den telemetrisch erhobenen Daten der Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität wieder. Versuchs- und Kontrollgruppe zeigen bereits vor der Manipulation einen charakteristischen Anstieg der Erregung (Arousal Reaktion). Die Erregung ist in den meisten Fällen auf eine Stunde begrenzt. Selbst das alleinige Öffnen des Käfigdeckels für einige Sekunden führt zu einer markanten Reaktion. Sowohl die Feststellung, dass Handling und Fixierung eine akute Stressantwort induzieren, als auch die Zeitbegrenzung auf circa eine Stunde decken sich mit den Beobachtungen anderer Autoren [Kasanen et al., 2011, Cinelli et al., 2007].

Verschiedene Formen der Blutentnahme und Kennzeichnung können als eine ähnliche Gruppe von Prozeduren angesehen werden, die eine gleichförmige Reaktion hervorrufen. Das Ausmaß dieser Reaktion wird in erster Linie durch die Fixierung an sich bestimmt, was mit den Aussagen von Kasanen und Cinelli übereinstimmt. Ausgenommen hiervon ist die Blutentnahme aus der Vena facialis und die Kennzeichnung mittels Ohrmarke. Für die hier erstmals beobachteten Auswirkungen der Punktion der V. facialis gibt es aktuell noch keine schlüssige Erklärung. Die Auswirkungen sind sehr heterogen und scheinbar unvorhersehbar. Bis zur endgültigen Klärung scheint es jedoch als angebracht, die Punktion der Vena facialis, insbesondere bei B6 Mäusen, als belastend einzustufen. Auch die Kennzeichnung mittels Ohrmarke muss als potentiell belastend eingestuft werden. Die Genetik übt ebenfalls einen großen Einfluss auf die Stressreaktion aus. Das sehr unterschiedliche Ausmaß der Reaktionen der C57BL/6 Mäuse und der BALB/c Mäusen zeigt, dass eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Stämme problematisch ist.

Die ausführlichen Aufzeichnungen des Tag/Nacht-Rhythmus in dieser Arbeit zeigen, dass die Aktivität von Mäusen einem festen Tagesrhythmus folgt. Dieser ist bei den B6 Tieren von einem biphasischen Verlauf in der Dunkelperiode geprägt, wie auch Li et al. bereits feststellten, und unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Stämmen [Li et al., 1999]. Die Langzeitbetrachtung zeigt zudem, dass es auch nach Wochen zu keiner vollständigen Gewöhnung der Mäuse an Handling oder Manipulationen kommt (siehe auch [Kramer et al., 2004]). Im chronischen Stressmodell, mit wiederholter Aussetzung gegenüber den Stressoren, zeigen die Tiere jedoch nach längerer Versuchsdauer eine reduzierte Reaktion.

Zuletzt zeigt sich ein unerwarteter Effekt im Zusammenhang mit der Fixierung im Nackengriff: In ausnahmslos allen Versuchsgruppen, die zur Blutentnahme oder Kennzeichnung derart fixiert wurden, kommt es zu einem plötzlichen und kurzzeitigen Absinken der Herzfrequenz. Dies könnte durch die veränderten Druck- und Stauungs-

vorgänge im Halsbereich bedingt sein. Es ist nicht völlig auszuschließen, dass hier ein technisches Artefakt beim Messvorgang auftritt, das beispielsweise durch ein Verschieben der Elektroden ausgelöst wird. Letzteres ist jedoch durch die sichere Befestigung der negativen Elektrode zwischen den *Musculi semispinales capitis et cervicis* eher unwahrscheinlich.

### 5.3.1 Ausblick

Die grundlegende Frage, die sich aus den vorliegenden Ergebnissen ergibt, betrifft die Bewertung der charakteristischen *Arousal Reaktion*. Sie entsteht als Reaktion auf einen Stressor in der Inaktivitätsphase. In diesem Zusammenhang muss nochmal auf die Tatsache hingewiesen werden, dass Labormäuse eine nachtaktive Spezies sind. Üblicherweise finden sämtliche tierexperimentelle Eingriffe, wie auch in dieser Arbeit, in der Helligkeitsphase statt und gehen so zwangsweise mit einer Störung der Tiere in ihrer Ruhephase einher. Aktuell kann die Frage, ob die durch experimentelle Eingriffe oder bloße Fixierung in der Ruhephase der Tiere induzierten starken Reaktionen von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität lediglich ein “Aufwachen” der Tiere darstellen, nicht klar beantwortet werden. Eine Wiederholung sämtlicher Versuche in der Aktivitätsperiode (Nacht) könnte interessante Ergebnisse bringen.

Eine Erweiterung der Untersuchungen um zusätzliche Inzuchtlinien, eventuell aber auch um Auszuchtlinien, wäre ebenso eine logische und wichtige Fortführung der Arbeit. Bereits die unterschiedlichen Reaktionen zwischen B6 und BALB/c Mäusen bei der Blutentnahme aus der Schwanzvene und der Vena facialis zeigen die große Variabilität der Stressantwort. Von großer Bedeutung wäre dies insbesondere bei den Teilversuchen *Kennzeichnung* und *Langzeitbelastung*, die aktuell nur in B6 Mäusen durchgeführt wurden.

In Ergänzung dieser Arbeit könnten die telemetrisch ermittelten Unterschiede anhand anderer Untersuchungsmethoden verifiziert werden. Denkbar wären histologische Untersuchungen, Verhaltensbeobachtungen oder die Messung von stressassoziierten Blutparametern wie Kortikosteron oder Glukose. Erstere wurden unter anderem von Ziegler durchgeführt, unterliegen jedoch dem dort beschriebenen Problem der schwierigen Beurteilung auf Grund unterschiedlicher Gewebezusammensetzungen und Heilungstendenzen [Ziegler, 2012]. Eine Ergänzung zur telemetrisch ermittelten Herzfrequenz könnte die Analyse der Herzfrequenzvariabilität (HFV) darstellen. Die HFV beschreibt die Fähigkeit des Herzens den zeitlichen Abstand zwischen zwei Herzschlägen belastungsabhängig zu verändern und gilt als Maß für die allgemeine Anpassungsfähigkeit [van Gestel et al., 2015]. Telemetrische Untersuchungen mit einer hierfür ausgelegte Datenerhebungs- und Auswertungssoftware ermöglichen eine Berechnung ausgewählter HFV-Parameter. Untersuchungen sowohl beim Mensch als auch bei verschiedenen Tierspezies konnten die Bedeutung der HFV als einen Indikator für Stress und Schmerz zeigen [Thayer et al., 2012, von Borell et al., 2007, Riet-

mann et al., 2004, Gehrmann et al., 2000]. So führten beispielsweise postoperative Schmerzen bei Mäusen zu einer Abnahme der Herzfrequenzvariabilität [Arras et al., 2007a]. Standardisierte Untersuchungen zur Herzfrequenzvariabilität bei unterschiedlichen Mausstämmen und dem Einfluss von Stress auf die HFV wären nach aktueller Literaturlage erstrebenswert und könnten in die Belastungsbeurteilung einbezogen werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen sind für zukünftige Forschungsprojekte folgende Schlussfolgerungen zu ziehen: Jegliche Manipulation an der Maus ist mit Stress und den damit einhergehenden metabolischen und hormonellen Konsequenzen verbunden. Hierbei herrschen Unterschiede zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c. Die Einflüsse von chronischem Stress auf den Tag/Nacht-Rhythmus sind überschaubar, müssen aber in Abhängigkeit der Fragestellung berücksichtigt werden.

Als Beitrag zum Refinement lässt sich festhalten: von einer Kennzeichnung mittels Metallohrmarke ist abzuraten, hier sind belastungsärmere Methoden verfügbar. Ebenso sollte eine Punktion der Vena facialis aktuell eher kritisch bewertet werden und ist möglichst durch andere Blutentnahmeformen zu ersetzen.

Es gilt noch einmal zu betonen, dass ein ruhiger und leiser Umgang mit den Tieren sowie eine sichere Fixierung mit zügiger Durchführung der Maßnahme (unabhängig von der gewählten Methode) überflüssigen Stress vermeidet und somit einen wichtigen Beitrag zum Wohlbefinden der Mäuse leisten kann.

### 5.3.2 Replace, Reduce, Refine

Bei vielen wissenschaftlichen Fragestellungen ist das Replacement-Prinzip, dass den Ersatz von tierexperimentellen Ansätzen durch tierversuchsfreie Verfahren fordert, nicht anwendbar. Komplexe Fragestellungen, die den ganzen Organismus betreffen, können häufig nur im Tiermodell zufriedenstellend beantwortet werden. Da Tierversuche aktuell für die biomedizinische Forschung notwendig und unabdingbar sind, kommt den Komponenten *Reduce* und *Refine* eine große Bedeutung zu. Die Telemetrie sowie der in dieser Arbeit angewandte Versuchsaufbau erlauben es zum einen, die transmitterimplantierten Mäuse mehrfach zu verwenden, und sie, zum anderen, gleichzeitig als ihre eigene Kontrollgruppe einzusetzen. Dieser Ansatz lässt beim selben Tier eine Entwicklung der Werte beobachten und dient so als longitudinale Kontrolle. Gleichzeitig kann damit eine merkliche Reduktion der benötigten Versuchstiere erreicht werden. Um statistische Aussagen treffen zu können, ist weiterhin aber eine ausreichende Gruppengröße notwendig. Die hauptsächliche Leistung der Telemetrie besteht jedoch darin, dass sie eine ausgesprochen zuverlässige Technik zur Belastungsbeurteilung darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen deshalb maßgeblich zu einem Refinement bei.



# 6 Zusammenfassung

## Telemetrische Untersuchungen zur Belastung von Mäusen durch verschiedene Methoden der Blutentnahme, Kennzeichnung und durch chronischen Stress

Tierversuche sind in vielen Bereichen der Wissenschaft immer noch unabdingbar. Daher kommt den Komponenten *Reduce* und *Refine* des 3R-Prinzips nach Russel und Burch eine große tierschutzrechtliche und ethische Bedeutung zu. Gerade zur Verwirklichung des *Refinement* wird eine objektive und reproduzierbare Erfassung der Belastung benötigt. Es liegen aktuell in der Literatur nur wenige Studien vor, die die Belastung bei spezifischen Eingriffen aufzeigen und daraus Empfehlungen zur Wahl der schonendsten Methoden ableiten. In diesem Bereich besteht weiterhin ein erheblicher Forschungsbedarf.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Belastung durch einmalig durchgeführte typische experimentelle Techniken und durch chronischen Stress quantitativ zu erfassen und zu beurteilen, um daraus letztendlich den Schweregrad bestimmter Methoden abzuschätzen und entsprechende Empfehlungen aussprechen zu können. Eine akkurate und objektive Messmethode stellt dabei die Telemetrie dar. Durch Implantation eines Transmitters in das Versuchstier können kontinuierlich physiologische Parameter wie Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität in gewohnter Umgebung und ohne die Anwesenheit von Experimentatoren über lange Zeit aufgezeichnet werden. Um eine hohe Relevanz dieser Studie zu gewährleisten wurde die am häufigsten für Tierversuche genutzte Spezies, die Maus, gewählt. Als typische experimentelle Techniken wurden in dieser Arbeit zum einen Methoden der Blutentnahme und zum anderen Formen der Kennzeichnung untersucht. Die Auswirkungen von mildem chronischem Stress wurden im Rahmen eines Langzeitversuchs ermittelt.

Die Studie vergleicht die Blutentnahme aus der Vena saphena, der Schwanzvene, der Vena facialis und des retrobulbären Venenplexus. Die über vier Tage gemessenen telemetrischen Daten werden in drei verschiedenen Zeitfenstern mit unterschiedlicher Auflösung betrachtet und statistisch untersucht. Für diese Einzeleingriffe wurden weibliche C57BL/6J Mäuse verwendet, zur Blutentnahme aus der Schwanzvene und der Vena facialis ergänzend weibliche BALB/cJRj Mäuse. Vergleiche zwischen unterschiedlichen Kennzeichnungsmethoden erfolgten für eine Markierung mittels Ohrlochung, Metall-Ohrmarke, Plastik-Ohrmarke (RapID) und einen am Schwanz implantierten Mikrotransponder (p-Chip). Einbezogen in die Untersuchungen wurde das Set-

zen der Kennzeichnung, das Ablesen und das Tragen über vier Wochen bei weiblichen C57BL/6J Mäusen. Um die Auswirkungen eines chronischen Stressregimes mit mehreren Komponenten zu untersuchen, wurden mit Transmittern versehene Apoe<sup>-/-</sup> Mäuse über fünf Monate hinweg sowohl häufigem Käfigwechsel als auch Phasen der Einzelhaltung unterzogen und mit Western Diät gefüttert. Währenddessen wurden die stressrelevanten telemetrischen Parameter ebenso wie die Gewichtsentwicklung aufgezeichnet.

Es zeigt sich, dass verschiedene Formen der Blutentnahme und Kennzeichnung als eine ähnliche Gruppe von Prozeduren angesehen werden können, die eine gleichförmige Reaktion hervorrufen. Bereits Handling und Fixierung induzieren in der Heligkeitsperiode eine akute Stressantwort, die ungefähr eine Stunde anhält. Im chronischen Stressmodell kommt es über einen längeren Zeitraum zu einer Verringerung der Stressreaktion, jedoch zu keiner vollständigen Gewöhnung.

Für die Blutentnahme aus der Schwanzvene und der Vena saphena liegt keine Belastung vor, die über die Fixierungskomponente hinausgeht. Eine retrobulbäre Blutentnahme führt für die nachfolgenden Stunden zu zeitraumspezifisch signifikanten Veränderungen der Herzfrequenz mit höheren Werten in der Inaktivitätsphase. Besonders heterogen verhalten sich Mäuse nach einer Punktion der Vena facialis; hier fällt die Herzfrequenz bei einem Teil der Gruppe kurzzeitig auf 270 Herzschläge/min ab bevor sie erneut ansteigt. Die andere Hälfte der Gruppe reagiert unmittelbar nach dem Eingriff wie die entsprechend fixierten Kontrollen. Eine Punktion der Vena facialis ist demnach eher als belastend anzusehen was sich mit vorherigen Studien deckt. Vergleiche zwischen beiden verwendeten Stämmen zeigen deutliche Unterschiede im Verhalten. C57BL/6 Mäuse reagieren insgesamt sensibler und stärker als BALB/c Mäuse.

Die Kennzeichnung mittels p-Chip und Ohrlochung induziert keine Belastung, die über das Fixieren an sich hinausgeht. Das Anbringen der RapID, aber noch deutlicher der Metall-Ohrmarke, führt zu signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe und muss als belastend angesehen werden. In der Metall-Ohrmarkengruppe hält dieser Stress über den kompletten Tag des Setzens an, sie ist also von allen getesteten Kennzeichnungsformen die belastendste. Im anschließenden Tragen konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Chronisch milder Stress über einen längeren Zeitraum führt zu einem gewissen Grad an Gewöhnung, gleichzeitig ändern sich aber die Schlafphasen im Verlauf einer Woche. Mit zunehmender Versuchsdauer reagierten die Mäuse weniger gestresst in der Wochenmitte, zeigen aber auch ein weniger aktives Verhalten in der Dunkelperiode der zweiten Wochenhälfte. Die Fütterung der Spezialdiät führt zu einem signifikanten Anstieg aller Parameter in der Übersichtsdarstellung der durchschnittlichen Werte, die Gewichtszunahme wird jedoch nicht durch leichten chronischen Stress beeinflusst.

# 7 Summary

## **Studying discomfort in mice induced by different methods of blood sampling, tagging and by chronic stress using telemetric monitoring**

Balancing animal welfare and the irrevocable use of animals in a laboratory setting is an ethical and legal challenge in biomedical research. According to Russel and Burch's 3R principle, animal experiments are not only to be reduced and replaced whenever possible, but also refined towards better conditions for the animal. In order to refine the way experiments are conducted one needs to be able to objectively and reproducibly assess pain and discomfort during experimentation. To date, there are only sparse studies in the literature which quantify the stress associated with specific experimental procedures. Further research is needed on the discomfort associated with animal testing to be able to choose the most appropriate methods and hence refine experimentation.

The goal of this study is to quantify the discomfort caused by typical experimental procedures and chronic stress. It further aims at evaluating their severity in order to determine methods that are to be favored above others. Telemetry is an accurate and reliable method for objective estimation. The implantation of a radio transmitter into the animals allows for a continuous collection of physiological parameters such as heart rate, body temperature and activity over a long period in undisturbed animals in their accustomed environment and without the presence of investigators. Mice are chosen as study objects since they are the most commonly used laboratory animal. The typical experimental procedures analyzed here include methods of blood collection and identification. Long-time experiments with mixed mild stressors assess the impact of chronic stress.

Different methods of blood sampling are compared: collecting from the saphenous vein, the tail vein, the facial vein and from the retro-orbital plexus. The telemetrically measured parameters over a period of four days are visualized and statistically analyzed using three different time frames and resolutions. The tests are carried out in female C57BL/6J mice and additionally in female BALB/cJRj mice for the tail and facial veins. Methods of identification include ear punches, metal ear tags, plastic ear tags (RapID) and implanted microtransponders (p-Chip). They are evaluated in regard to the stress caused by attaching them, reading it and carrying it over several weeks in female C57BL/6J. Finally, a long-term study over 5 month tests the influence of chronic stress on the circadian rhythm of mice by carrying out cage changes,

---

removing social partners and feeding Western diet. Both stress-related physiological parameters as well as body weight are measured.

Results of this study are clearly indicating that different methods of blood collection and identification can generally be seen as a set of similar procedures which mice react to in the same way. Mere restraining induces a direct stress reaction during day-time that lasts for roughly one hour. The reaction to chronic stress decreases when repeated over several weeks as our long-term study shows, but no complete habituation is reached.

Collecting blood from the tail and saphenous veins does not invoke significantly more stress than solely restraining the mice. Puncturing the retro-orbital plexus, on the other hand, induces a time-specifically significant change in heart rate, with higher values for several hours during the time of inactivity. Notably, the reaction to puncture of the facial vein is highly heterogeneous: half of the mice follow the reaction of the control group, whereas the other half show a massive but momentary drop in heart rate to around 270 bpm. Therefore blood collection from the facial vein is to be classified as the method with the highest burden amongst the ones evaluated. At last, the comparison of two strains reveal notable differences in the stress reaction, whereas C57BL/6 mice react stronger and more sensitive than BALB/c mice.

Among identification methods, no significant stress reaction above the one caused by restraining can be detected when p-Chips or ear punches are applied. However, when RapIDs and especially metal ear tags are used, mice suffer from discomfort for up to the whole day. Metal ear tags clearly are the least appropriate method of identification. From the second day on though, mice carrying the ear tag or any other means of identification do not differentiate significantly from their controls anymore.

In the long-term study to chronic stress mice adapt partially to the repeated stressors. Meanwhile their phases of sleep vary in the course of the week. While their stress reaction slightly declines over time they also show less activity at night in the second half of the week. The exposure to the Western diet leads to a significant increase in heart rate, body temperature and activity, which is tied to the positive effect of the Western diet on metabolism.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>3R</b>	Replace, Reduce, Refine
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropes Hormon
<b>Akt.</b>	Aktivität
<b>AU</b>	Arbitrary Unit (unskalierte Einheit)
<b>B6</b>	Mausstamm C57BL/6J
<b>BALB/c</b>	Mausstamm BALB/cJRj
<b>bpm</b>	beats per minute (Schläge pro Minute)
<b>BVET</b>	Bundesamt für Veterinärwesen, Schweiz (mittlerweile: Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV)
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>DKFZ</b>	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
<b>DSI</b>	Data Sciences International, USA
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>FELASA</b>	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
<b>G</b>	Gauge, Feinheit des Außendurchmessers bei Kanülen
<b>GV-SOLAS</b>	Gesellschaft für Versuchstierkunde - society of laboratory animal science
<b>h</b>	hora (Stunde)
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>HFV</b>	Herzfrequenzvariabilität
<b>IE</b>	Internationale Einheit

<b>KGW</b>	Körpergewicht
<b>min</b>	Minuten
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>s</b>	signifikant
<b>sec</b>	secunda (Sekunden)
<b>SEM</b>	standard error of the mean (Standardfehler)
<b>Temp.</b>	Temperatur
<b>V.</b>	Vena (Vene)

# Tabellenverzeichnis

2.1	Relevante physiologische Parameter der Maus . . . . .	7
2.2	Methoden zur Erkennung von Schmerz und Stress bei Labortieren . .	10
3.1	Übersicht der verwendeten Mausstämme . . . . .	29
3.2	Inhaltsstoffe Kliba Nr. 3437 . . . . .	30
3.3	Technische Daten des Transmitters ETA-F10 . . . . .	30
3.4	Verwendete Materialien zur Blutentnahme . . . . .	38
3.5	Versuchsplan für die Untersuchungen zur Blutentnahme . . . . .	39
3.6	Verwendete Materialien zur Kennzeichnung . . . . .	43
3.7	Inhaltsstoffe Kliba Nr. 2480, Experimentalfuttermittel <i>Western Diet</i> .	45
3.8	Verteilung der Stressoren zur chronischen Stressbelastung in der Ver- suchsgruppe . . . . .	46
3.9	Darstellungsmodi des Versuchs Blutentnahme . . . . .	47
3.10	Darstellungsmodi des Versuchs Kennzeichnung . . . . .	48
3.11	Darstellungsmodi des Versuchs chronischer Stress . . . . .	48
4.1	Statistische Ergebnisse der Blutentnahme . . . . .	80
4.2	Statistische Ergebnisse der Kennzeichnung . . . . .	101
4.3	Statistische Ergebnisse des chronischen Stressmodells . . . . .	112

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Darstellung der Schwanzvene . . . . .	15
2.2	Standardschema Ohrlochung . . . . .	19
2.3	RapID Ohrmarke . . . . .	21
2.4	Aufbau und Funktionsweise des p-Chips . . . . .	22
3.1	Aufbau einer Telemetrieanlage . . . . .	31
3.2	Ungekürzter und gekürzter Transmitter . . . . .	32
3.3	Zeitliche Darstellung der Vorbereitung . . . . .	34
3.4	Fixierung zur Blutentnahme aus der Vena facialis . . . . .	36
3.5	Fixierung zur Blutentnahme aus der Schwanzvene . . . . .	36
3.6	Fixierung zur Blutentnahme aus der Vena saphena . . . . .	37
3.7	Lagerung der narkotisierten Maus zur retrobulbären Blutentnahme . . . . .	38
3.8	Zeitliche Darstellung zum Versuchsverlauf bei der Kennzeichnung . . . . .	40
3.9	Ohrlochung (Setzen und Ablesen) . . . . .	41
3.10	Ohrmarke (Setzen und Ablesen) . . . . .	42
3.11	RapID (Setzen und Ablesen) . . . . .	42
3.12	p-Chip (Setzen und Ablesen) . . . . .	43
4.1	Akute Phase, V. saphena (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	53
4.2	Arousal Phase, V. saphena (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	54
4.3	Tag/Nacht-Rhythmus, V. saphena (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	55
4.4	Akute Phase, Schwanzvene (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	57
4.5	Arousal Phase, Schwanzvene (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	58
4.6	Tag/Nacht-Rhythmus, Schwanzvene (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	59
4.7	Akute Phase, Schwanzvene (HF, Temp., Akt.), BALB/c . . . . .	61
4.8	Arousal Phase, Schwanzvene (HF, Temp., Akt.), BALB/c . . . . .	62
4.9	Tag/Nacht-Rhythmus, Schwanzvene (HF, Temp., Akt.), BALB/c . . . . .	63
4.10	Akute Phase, V. facialis (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	66
4.11	Akute Phase, V. facialis (HF, Temp., Akt.), B6, Teilgruppen . . . . .	67
4.12	Arousal Phase, V. facialis (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	68
4.13	Arousal Phase, V. facialis (HF, Temp., Akt.), B6, Teilgruppen . . . . .	69
4.14	Tag/Nacht-Rhythmus, V. facialis (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	70
4.15	Akute Phase, V. facialis (HF, Temp., Akt.), BALB/c . . . . .	72
4.16	Arousal Phase, V. facialis (HF, Temp., Akt.), BALB/c . . . . .	73



---

4.17 Tag/Nacht-Rhythmus, V. facialis (HF, Temp., Akt.), BALB/c . . . .	74
4.18 Akute Phase, retrobulbärer Venenplexus (HF, Temp., Akt.), B6 . . .	77
4.19 Arousal Phase, retrobulbärer Venenplexus (HF, Temp., Akt.), B6 . .	78
4.20 Tag/Nacht-Rhythmus, retrobulbärer Venenplexus (HF, Temp., Akt.), B6 . . . . .	79
4.21 Akute Phase, Setzen der Ohrkennzeichnung, B6 . . . . .	83
4.22 Arousal Phase, Setzen der Ohrkennzeichnung, B6 . . . . .	84
4.23 Tag/Nacht-Rhythmus, Setzen der Ohrkennzeichnung, B6 . . . . .	85
4.24 Akute Phase, Ablesen der Ohrkennzeichnung, B6 . . . . .	88
4.25 Arousal Phase, Ablesen der Ohrkennzeichnung, B6 . . . . .	89
4.26 Tag/Nacht-Rhythmus, Ablesen der Ohrkennzeichnung, B6 . . . . .	90
4.27 Tag/Nacht-Rhythmus des Tragens - Ohrmarkierung, B6 . . . . .	91
4.28 Akute Phase, Setzen des p-Chips, B6 . . . . .	93
4.29 Arousal Phase, Setzen des p-Chips, B6 . . . . .	94
4.30 Tag/Nacht-Rhythmus, Setzen des p-Chips, B6 . . . . .	95
4.31 Akute Phase, Lesen des p-Chips, B6 . . . . .	97
4.32 Arousal Phase, Lesen des p-Chips, B6 . . . . .	98
4.33 Tag/Nacht-Rhythmus, Lesen des p-Chip, B6 . . . . .	99
4.34 Tag/Nacht-Rhythmus des Tragens - p-Chip, B6 . . . . .	100
4.35 Übersichtsdarstellung der Herzfrequenz während chronischem Stress .	103
4.36 Übersichtsdarstellung der Temperatur während chronischem Stress . .	104
4.37 Übersichtsdarstellung der Aktivität während chronischem Stress . . .	104
4.38 1. Versuchswoche; chronisches Stressmodell; Tag/Nacht-Rhythmus . .	106
4.39 5. Versuchswoche; chronisches Stressmodell; Tag/Nacht-Rhythmus . .	107
4.40 9. Versuchswoche; chronisches Stressmodell; Tag/Nacht-Rhythmus . .	108
4.41 13. Versuchswoche; chronisches Stressmodell; Tag/Nacht-Rhythmus .	109
4.42 17. Versuchswoche; chronisches Stressmodell; Tag/Nacht-Rhythmus .	110
4.43 Gewichtsentwicklung; chronisches Stressmodell . . . . .	111

# Literaturverzeichnis

- [Aasland et al., 2010] Aasland, K. E., Skjerve, E., and Smith, A. J. (2010). Quality of blood samples from the saphenous vein compared with the tail vein during multiple blood sampling of mice. *Laboratory Animals*, 44(1):25–29.
- [Arras et al., 2007a] Arras, M., Rettich, A., Cinelli, P., Kasermann, H. P., and Burki, K. (2007a). Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC veterinary research*, 3(1):16.
- [Arras et al., 2007b] Arras, M., Rettich, A., Seifert, B., Kasermann, H. P., and Rulicke, T. (2007b). Should laboratory mice be anaesthetized for tail biopsy? *Laboratory Animals*, 41(1):30–45.
- [Axelsson et al., 2007] Axelsson, M., Dang, Q., Pitsillides, K., Munns, S., Hicks, J., and Kassab, G. S. (2007). A novel, fully implantable, multichannel biotelemetry system for measurement of blood flow, pressure, ECG, and temperature. *Journal of applied physiology*, 102(3):1220–1228.
- [Balcombe et al., 2004] Balcombe, J. P., Barnard, N. D., and Sandusky, C. (2004). Laboratory Routines Cause Animal Stress. *American Association for Laboratory Animal Science*, 43(6):42–51.
- [Baron et al., 2005] Baron, B. W., Langan, G., Huo, D., Baron, J. M., and Montag, A. (2005). Squamous cell carcinomas of the skin at ear tag sites in aged FVB/N mice. *Comparative Medicine*, 55(3):231–235.
- [Baumans et al., 2001] Baumans, V., Bouwknecht, J. A., Boere, H., Kramer, K., van Lith, H. A., van de Weerd, H. A., and van Herck, H. (2001). Intra-Abdominal Transmitter Implantation in Mice: Effects on Behaviour and Body Weight. *Animal Welfare*, 10(3):291–302.
- [Belzung and Griebel, 2001] Belzung, C. and Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2):141–149.
- [Cesarovic et al., 2011] Cesarovic, N., Jirkof, P., Rettich, A., and Arras, M. (2011). Implantation of Radiotelemetry Transmitters Yielding Data on ECG, Heart Rate, Core Body Temperature and Activity in Free-moving Laboratory Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 57:2–7.

- 
- [Cheeta et al., 1997] Cheeta, S., Ruigt, G., Van Proosdij, J., and Willner, P. (1997). Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biological Psychiatry*, 41(4):419–427.
- [Christensen et al., 2009] Christensen, S. D., Mikkelsen, L. F., Fels, J. J., Bodvarsdóttir, T. B., and Hansen, A. K. (2009). Quality of plasma sampled by different methods for multiple blood sampling in mice. *Laboratory Animals*, 43(1):65–71.
- [Cinelli et al., 2007] Cinelli, P., Rettich, A., Seifert, B., Bürki, K., and Arras, M. (2007). Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Laboratory Animals*, 41(2):174–184.
- [Clement et al., 1989] Clement, J. G., Mills, P., and Brockway, B. (1989). Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. *Journal of pharmacological methods*, 21(2):129–140.
- [Cover et al., 1989] Cover, C. E., Keenan, C. M., and Bettinger, G. E. (1989). Ear tag induced *Staphylococcus* infection in mice. *Laboratory Animals*, 23(3):229–233.
- [Crabbe et al., 1999] Crabbe, J. C., Wahlsten, D., and Dudek, B. C. (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, 284(5420):1670–1672.
- [Crawley et al., 1997] Crawley, J. N., Belknap, J. K., Collins, A., Crabbe, J. C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R. J., Maxson, S. C., Miner, L. L., Silva, A. J., Wehner, J. M., Wynshaw-Boris, A., and Paylor, R. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, 132:107–124.
- [Dahlborn et al., 2013] Dahlborn, K., Bugnon, P., Nevalainen, T., Raspa, M., Verbost, P., and Spangenberg, E. (2013). Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory Animals*, 47(1):2–11.
- [Diehl et al., 2001] Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., and van de Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21(1):15–23.
- [Erhardt et al., 2012] Erhardt, W., Kölle, P., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., and Tacke, S. (2012). *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Schattauer.

- 
- [Europäische Kommission, 2013] Europäische Kommission (2013). *Siebenter Bericht über die statistischen Angaben zur Anzahl der in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*. Bericht der Kommission an den Rat und das europäische Parlament.
- [Ewringmann and Glöckner, 2014] Ewringmann, A. and Glöckner, B. (2014). *Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus: Diagnostischer Leitfaden und Therapie*. kleintier konkret Praxisbuch. Enke.
- [Forbes et al., 2010] Forbes, N., Brayton, C., Grindle, S., Shepherd, S., Tyler, B., and Guarnieri, M. (2010). Morbidity and mortality rates associated with serial bleeding from the superficial temporal vein in mice. *Lab Animal*, 39(8):236–240.
- [Foster et al., 2014] Foster, H., Small, J., and Fox, J. (2014). *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Immunology, and Husbandry*. Elsevier Science.
- [Fox et al., 2006] Fox, J., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C., Quimby, F., and Smith, A. (2006). *The Mouse in Biomedical Research: History, Wild Mice, and Genetics*. American College of Laboratory Animal Medicine. Elsevier Science.
- [Freudig, 2006] Freudig, D. (2006). *Lexikon der Biologie (Studienausgabe): Gesamtausgabe in 14 Bänden*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Gehrmann et al., 2000] Gehrmann, J., Hammer, P. E., Maguire, C. T., Wakimoto, H., Friedman, J. K., and Berul, C. I. (2000). Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 279(2):733–740.
- [Golde et al., 2005] Golde, W., Gollobin, P., and Rodriguez, L. (2005). A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Animal*, 34(9):39–43.
- [Grenwis, 2010] Grenwis, J. E. (2010). Recent advances in telemetry promote further progress in reduction and refinement. *NC3Rs*, (Invited Articles):1–9.
- [Gruda et al., 2010] Gruda, M. C., Pinto, A., Craelius, A., Davidowitz, H., Kopacka, W. M., Li, J., Qian, J., Rodriguez, E., Kuspiel, E., and Mandecki, W. (2010). A System for Implanting Laboratory Mice with Light-Activated Microtransponders. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49(6):1–6.
- [GV-SOLAS, 1992] GV-SOLAS (1992). Schmerz und Distress bei Labornagern und Kaninchen.
- [GV-SOLAS, 2007] GV-SOLAS (2007). Ausschuss für tiergerechte Labortierhaltung: Labormäuse.

- 
- [GV-SOLAS, 2009] GV-SOLAS (2009). Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS: Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren.
- [Harkin et al., 2002] Harkin, A., Connor, T. J., O'Donnell, J. M., and Kelly, J. P. (2002). Physiological and behavioral responses to stress: what does a rat find stressful? *Lab Animal*, 31(4):42–50.
- [Hedrich, 2012] Hedrich, H. (2012). *The laboratory mouse*. Academic Press.
- [Hem et al., 1998] Hem, A., Smith, A. J., and Solberg, P. (1998). Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Laboratory Animals*, 32(4):364–368.
- [Hoff, 2000] Hoff, J. (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal*, 29(10):47–53.
- [Hoffmann et al., 2014] Hoffmann, B., Schmitt, J., Largiadèr, F., Sturm, A., Wicki, O., Hamm, C., and Willems, S. (2014). *Checkliste EKG*. Thieme.
- [Kant et al., 1995] Kant, G. J., Pastel, R. H., Bauman, R. A., Meininger, G. R., Maughan, K. R., Robinson, T. N., Wright, W. L., and Covington, P. S. (1995). Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiology & Behavior*, 57(2):359–365.
- [Kasanen et al., 2011] Kasanen, I. H. E., Voipio, H.-M., Leskinen, H., Luodonpää, M., and Nevalainen, T. O. (2011). Comparison of ear tattoo, ear notching and micro-tattoo in rats undergoing cardiovascular telemetry. *Laboratory Animals*, 45(3):154–159.
- [Kitagaki and Hirota, 2007] Kitagaki, M. and Hirota, M. (2007). Auricular chondritis caused by metal ear tagging in C57BL/6 mice. *Veterinary pathology*, 44(4):458–466.
- [Kramer et al., 2001] Kramer, K., Kinter, L., Brockway, B. P., Voss, H. P., Remie, R., and van Zutphen, B. L. (2001). The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science*, 40(1):8–16.
- [Kramer and Kinter, 2003] Kramer, K. and Kinter, L. B. (2003). Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiological genomics*, 13(3):197–205.
- [Kramer et al., 1993] Kramer, K., van Acker, S. A. B. E., Voss, H. P., Grimbergen, J. A., van der Vijgh, W. J. F., and Bast, A. (1993). Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 30(4):209–215.

- 
- [Kramer et al., 2004] Kramer, K., van de Weerd, H., Mulder, A., van Heijningen, C., Baumans, V., Remie, R., Voss, H.-P., and van Zutphen, B. F. (2004). Effect of conditioning on the increase of heart rate and body temperature provoked by handling in the mouse. *Alternatives to Laboratory Animals*, 32(1):177–181.
- [Kretlow et al., 2010] Kretlow, A., Butzke, D., Goetz, M. E., Grune, B., Halder, M., Henkler, F., Liebsch, M., Nobiling, R., Oelgeschlaeger, M., Reifenberg, K., Schaefer, B., Seiler, A., and Luch, A. (2010). Implementation and enforcement of the 3Rs principle in the field of transgenic animals used for scientific purposes. Report and recommendations of the BfR expert workshop, May 18-20, 2009, Berlin, Germany. *ALTEX*, 27(2):117–134.
- [Kumari et al., 2003] Kumari, M., Grahame-Clarke, C., Shanks, N., Marmot, M., Lightman, S., and Vallance, P. (2003). Chronic stress accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. *Stress*, 6(4):297–299.
- [Le Calvez et al., 2006] Le Calvez, S., Perron-Lepage, M. F., and Burnett, R. (2006). Subcutaneous microchip-associated tumours in B6C3F1 mice: A retrospective study to attempt to determine their histogenesis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(4):255–265.
- [Leon et al., 2004] Leon, L. R., Walker, L. D., du Bose, D. A., and Stephenson, L. A. (2004). Biotelemetry transmitter implantation in rodents: impact on growth and circadian rhythms. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286(5):967–974.
- [Li et al., 1999] Li, P., Sur, S. H., Mistlberger, R. E., and Morris, M. (1999). Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. *The American journal of physiology*, 276(2):500–504.
- [Madetoja et al., 2009] Madetoja, J., Madetoja, M., Mäkinen, J., Riuttala, E., and Jokinen, J. (2009). Blood sampling from the tail vein, in comparison with two other techniques, causes less stress to mice. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 36(2):215–221.
- [Mähler et al., 2014] Mähler, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., and Raspa, M. (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*, 48(3):178–192.
- [Malakoff, 2000] Malakoff, D. (2000). The Rise of the Mouse, Biomedicine’s Model Mammal. *Science*, 288(5464):248–253.
- [Martí et al., 1994] Martí, O., Martí, J., and Armario, A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & Behavior*, 55(4):747–53.

- 
- [McGuill and Rowan, 1989] McGill, M. W. and Rowan, A. N. (1989). Perspectives on Animal Use Biological Effects of Blood Loss : Implications for Sampling Volumes and Techniques. *Institute for Laboratory Animal Research*, 31(4):5–20.
- [Meijer et al., 2007] Meijer, M. K., Sommer, R., Spruijt, B. M., van Zutphen, L. F. M., and Baumans, V. (2007). Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Laboratory Animals*, 41(2):161–173.
- [Meijer et al., 2006] Meijer, M. K., Spruijt, B. M., van Zutphen, L. F. M., and Baumans, V. (2006). Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Laboratory Animals*, 40(4):382–391.
- [Mills et al., 2000] Mills, P. A., Huettelman, D. A., Brockway, B. P., Zwiers, L. M., Gelsema, A. J., Schwartz, R. S., and Kramer, K. (2000). A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry. *Journal of applied physiology*, 88(5):1537–1544.
- [Mogil et al., 1999] Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bon, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., Elmer, G. I., Chung, J. M., and Devor, M. (1999). Heritability of nociception I: Responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*, 80(1-2):67–82.
- [Morton and Griffiths, 1985] Morton, D. and Griffiths, P. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Veterinary Record*, 116:431–436.
- [Nakashima et al., 1994] Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., and Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*, 14(1):133–140.
- [New, 1978] New, A. E. (1978). Identification of small animals—procedures and problems. *Clinical toxicology*, 13(5):601–610.
- [Oka et al., 2001] Oka, T., Oka, K., and Hori, T. (2001). Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature. *Psychosomatic medicine*, 63(3):476–486.
- [Okutsu et al., 2014] Okutsu, M., Lira, V. A., Higashida, K., Peake, J., Higuchi, M., and Suzuki, K. (2014). Corticosterone accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Atherosclerosis*, 232(2):414–419.
- [Papale et al., 2005] Papale, L. A., Andersen, M. L., Antunes, I. B., Alvarenga, T. A. F., and Tufik, S. (2005). Sleep pattern in rats under different stress modalities. *Brain Research*, 1060(1-2):47–54.

- 
- [Pendse et al., 2009] Pendse, A. A., Arbones-Mainar, J. M., Johnson, L. A., Altenburg, M. K., and Maeda, N. (2009). Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *Journal of lipid research*, 50:178–182.
- [Popesko et al., 1990] Popesko, P., Rajtová, V., and Horák, J. (1990). *A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals; Volume 2: Rat, Mouse, Hamster*. Saunders Ltd.
- [Pschyrembel, 2013] Pschyrembel, W. (2013). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (2014)*. Walter de Gruyter.
- [Rietmann et al., 2004] Rietmann, T., Stauffacher, M., Bernasconi, P., Auer, J., and Weishaupt, M. (2004). The association between heart rate, heart rate variability, endocrine and behavioural pain measures in horses suffering from laminitis. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 51(5):218–225.
- [Russell et al., 1959] Russell, W. M. S., Burch, R. L., and Hume, C. W. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen London.
- [Schlichting, 2010] Schlichting, A. (2010). *Stressbelastung durch die von der GV-SOLAS empfohlenen Blutentnahmemethoden bei der Maus*. Masterarbeit.
- [Sgoifo et al., 1994] Sgoifo, A., Stilli, D., Aimi, B., Parmigiani, S., Manghi, M., and Musso, E. (1994). Behavioral and electrocardiographic responses to social stress in male rats. *Physiology & Behavior*, 55(2):209–216.
- [Sorge et al., 2014] Sorge, R. E., Martin, L. J., Isbester, K. A., Sotocinal, S. G., Rosen, S., Tuttle, A. H., Wieskopf, J. S., Acland, E. L., Dokova, A., Kadoura, B., Leger, P., Mapplebeck, J. C. S., McPhail, M., Delaney, A., Wigerblad, G., Schumann, A. P., Quinn, T., Frasnelli, J., Svensson, C. I., Sternberg, W. F., and Mogil, J. S. (2014). Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nature methods*, 11(6):629–32.
- [Späni et al., 2003] Späni, D., Arras, M., König, B., and Rüllicke, T. (2003). Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs. *Laboratory Animals*, 37(1):54–62.
- [Stämpfli et al., 2014] Stämpfli, S. F., Camici, G. G., Keller, S., Rozenberg, I., Arras, M., Schuler, B., Gassmann, M., Garcia, I., Lüscher, T. F., and Tanner, F. C. (2014). Restraint stress enhances arterial thrombosis in vivo – role of the sympathetic nervous system. *Stress*, 17(1):126–132.
- [Staszyk et al., 2003] Staszyk, C., Bohnet, W., Gasse, H., and Hackbarth, H. (2003). Blood vessels of the rat tail: a histological re-examination with respect to blood vessel puncture methods. *Laboratory Animals*, 37(2):121–125.



- 
- [Thayer et al., 2012] Thayer, J. F., Ahs, F., Fredrikson, M., Sollers, J. J., and Wager, T. D. (2012). A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(2):747–56.
- [Tillmann et al., 1997] Tillmann, T., Kamino, K., Dasenbrock, C., Ernst, H., Kohler, M., Morawietz, G., Campo, E., Cardesa, A., Tomatis, L., and Mohr, U. (1997). Subcutaneous soft tissue tumours at the site of implanted microchips in mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, 49(3-4):197–200.
- [van den Buuse et al., 2001] van den Buuse, M., van Acker, S. A., Fluttert, M., and de Kloet, E. R. (2001). Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological “novelty” stress in freely moving rats. *Psychophysiology*, 38(3):490–499.
- [van der Heyden et al., 1997] van der Heyden, J. A. M., Zethof, T. J. J., and Olivier, B. (1997). Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiology & Behavior*, 62(3):463–470.
- [van Gestel et al., 2015] van Gestel, A., Teschler, H., Steier, J., Rausch-Osthoff, A., Teschler, S., and Köhler, B. (2015). *Physiotherapie bei chronischen Atemwegs- und Lungenerkrankungen: Evidenzbasierte Praxis*. Springer Berlin Heidelberg.
- [van Herck et al., 2000] van Herck, H., Baumans, V., Boere, H. A., Hesp, A. P., van Lith, H. A., and Beynen, A. C. (2000). Orbital sinus blood sampling in rats: effects upon selected behavioural variables. *Laboratory Animals*, 34(1):10–19.
- [van Herck et al., 1998] van Herck, H., Baumans, V., Brandt, C. J., Hesp, A. P., Sturkenboom, J. H., van Lith, H. A., van Tintelen, G., and Beynen, A. C. (1998). Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise. *Laboratory Animals*, 32(4):377–386.
- [van Herck et al., 2001] van Herck, H., Baumans, V., Brandt, C. J. W. M., Boere, H. A. G., Hesp, A. P. M., van Lith, H. A., Schurink, M., and Beynen, A. C. (2001). Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the tail vein in rats : comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Laboratory Animals*, 35(2):131–139.
- [van Herck et al., 1992] van Herck, H., Baumans, V., van der Craats, N. R., Hesp, A. P., Meijer, G. W., van Tintelen, G., Walvoort, H. C., and Beynen, A. C. (1992). Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture. *Laboratory Animals*, 26(1):53–58.

- 
- [van Herck et al., 1997] van Herck, H., de Boer, S. F., Hesp, A. P., van Lith, H. A., Baumans, V., and Beynen, A. C. (1997). Orbital bleeding in rats while under diethylether anaesthesia does not influence telemetrically determined heart rate, body temperature, locomotor and eating activity when compared with anaesthesia alone. *Laboratory Animals*, 31(3):271–278.
- [von Borell et al., 2007] von Borell, E., Langbein, J., Després, G., Hansen, S., Leterrier, C., Marchant-Forde, J., Marchant-Forde, R., Minero, M., Mohr, E., Prunier, A., Valance, D., and Veissier, I. (2007). Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals – a review. *Physiology & Behavior*, 92(3):293–316.
- [Weiss et al., 2014] Weiss, J., Becker, K., Bernsmann, E., Chourbaji, S., and Dietrich, H. (2014). *Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik*. Enke.
- [Williams et al., 2002] Williams, T. D., Chambers, J. B., Henderson, R. P., Rashotte, M. E., and Overton, J. M. (2002). Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(5):1459–1467.
- [Zethof et al., 1994] Zethof, T. J., van der Heyden, J. A., Tolboom, J. T., and Olivier, B. (1994). Stress-induced hyperthermia in mice: a methodological study. *Physiology & Behavior*, 55(1):109–115.
- [Zhang et al., 2010] Zhang, T., Chen, Y., Liu, H., Zhou, Z., Zhai, Y., and Yang, J. (2010). Chronic unpredictable stress accelerates atherosclerosis through promoting inflammation in apolipoprotein e knockout mice. *Thrombosis Research*, 126(5):386–392.
- [Ziegler, 2012] Ziegler, E. (2012). *Histologische Veränderungen nach verschiedenen Blutentnahmemethoden bei der Maus*. Dissertation.

# Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt, mich außer den angegebenen keiner anderen Hilfsmittel bedient und alle Stellen, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Erhard danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität München und die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Kurt Reifenberg für die Initiierung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und Begleitung der Studie, die hilfreiche Korrektur und die intensive fachliche Ausbildung in der Versuchstierkunde.

Des Weiteren danke ich Dr. Nora Denk für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche und ihre jederzeit hilfreichen persönlichen und fachlichen Ratschläge.

Ein großes Dankeschön geht an Nina Baier für ihre geduldige und kompetente Einarbeitung in das Thema und die Operationstechnik, ihre zahlreichen Tipps zur Bedienung der Telemetrieanlage und ihr stets offenes Ohr bei Fragen rund um das Projekt trotz neuem Familien-Fulltime-Job.

Herrn Dr. Tim Holland-Letz möchte ich vielfach für die fundierte Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner umfangreichen Daten danken.

Allen Tierpflegern und besonders Frau Barbara Goedecke-Weichert danke ich für ihre wertvolle Hilfe und ihre ständige Bereitschaft Zusatzaufgaben im Rahmen des Telemetrieprojektes zu übernehmen.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen am ZPF und insbesondere bei den Mitarbeitern der Mikrobiologischen Diagnostik für die Schaffung einer entspannten, produktiven und familiären Arbeitsatmosphäre.

Für ihre spontane Hilfe bei den Bildern danke ich Alexa Wunsch.

Nicht minder aufreibend war die vergangene Zeit für Sascha und meine Familie, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Zuletzt, und gleichzeitig allen voran, gilt ihnen und ihrer Geduld und Nachsicht mein besonderer Dank.

Teile dieses Projekts wurden dankenswerterweise von der “Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation” unter dem Förderkennzeichen 961-38 62 61/976 finanziert.

*Allen Mäusen, die für die Durchführung dieser Studie ihr Wertvollstes gegeben haben.*